



**Ana Catarina Fernandes  
Moreirinha**

**Utilização da Espectroscopia de Infravermelho  
para análise de fiambre**



**Ana Catarina Fernandes  
Moreirinha**

**Utilização da Espectroscopia de Infravermelho  
para análise de fiambre**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Adelaide Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **O júri**

Presidente

**Profª Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha**  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Profª Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo**  
Professora Associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro  
(Orientadora)

**Profª Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz**  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior (Arguente)

**Profª Doutora Maria Adelaide Pinho Almeida**  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Co-orientadora)

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho:

À Doutora Ivonne Delgadillo pelo conhecimento científico que me transmitiu, pelas recomendações, dedicação e ajuda que me prestou ao longo de todo o trabalho;

À Doutora Adelaide Almeida por toda a ajuda, disponibilidade e dedicação demonstradas;

Ao Doutor António Barros e, em especial, à Doutora Alexandra Nunes pela enorme ajuda com a análise multivariada e por toda a paciência para as minhas dúvidas;

Aos meus amigos, em especial à Nádía, por todo o apoio e amizade e por estarem sempre presentes quando mais precisei;

À minha família, por todo o incentivo e pela confiança que sempre depositaram em mim.

## **Palavras-chave**

Análise microbiológica, Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier, Contaminação Microbiológica, Fiambre, Análise de Componentes Principais.

## **Resumo**

Face às crescentes exigências relativamente à qualidade alimentar, nomeadamente em termos microbiológicos, é importante que se desenvolvam métodos rápidos e eficazes para a detecção de contaminações.

Neste trabalho foram testadas as potencialidades da Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier na detecção de alterações em fiambre ao longo do tempo provocadas por microrganismos, bem como na distinção de diferentes colónias de microrganismos. Foi ainda testada a capacidade deste método de análise permitir a separação de tipos e marcas diferentes de fiambre.

Foram realizados diversos ensaios prévios utilizando o espectrómetro de FT-IR de forma a determinar quais os melhores métodos para analisar o produto em questão. Por fim, foram efectuados ensaios com fiambre fresco, fiambre embalado e diferentes colónias obtidas na superfície de fiambre, utilizando o FT-IR, sendo os resultados comparados com os obtidos por métodos microbiológicos tradicionais, sempre que possível.

Concluiu-se que, apesar de ser necessário um estudo mais exaustivo, a técnica de FT-IR permite separar facilmente diferentes colónias de microrganismos obtidas em fiambre, marcas de fiambre e distinguir fiambre de porco, peru e frango. Este método de análise permite ainda separar, em diversos casos, amostras de fiambre consoante a sua carga microbiana total ou grau de contaminação.

**Keywords**

Microbial analysis, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Microbial Contamination, Ham, Principal Component Analysis.

**Abstract**

To face the increasing demands for food quality, particularly in microbiological terms, it is important to develop rapid and effective methods for detecting contaminations

The present study evaluated the potential of Infrared Spectroscopy with Fourier Transform to detect changes in ham caused by microorganisms as function of time and to distinguish different microorganism colonies. We also tested the ability of this method of analysis to allow the separation of types and brands of ham.

Several preliminary tests were conducted using the FT-IR spectrometer to determine the best method to analyze the product in question. Finally, tests were made with freshly cut and packed ham and different colonies obtained from the ham surface and the results were compared with those obtained by traditional microbiological methods, whenever possible.

It was concluded that, despite of the necessity of further studies, FT-IR easily discriminates different colonies of microorganisms obtained in ham and distinguished different brands and types of ham (pork, turkey and chicken ham). This method of analysis also allows the separation, in several cases, of samples of ham according to their total microbial contamination.

# Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Os microrganismos e a alimentação.....	1
1.2. Contaminação de carnes processadas .....	1
1.3. Métodos tradicionais para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos .....	3
1.4. Métodos rápidos para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos.....	4
1.5. Espectroscopia de Infravermelho.....	5
1.5.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier .....	6
1.5.2. Aplicações da Espectroscopia de Infravermelho na análise de alimentos .....	9
2. Objectivos .....	10
3. Material e métodos.....	11
3.1. Ensaaios prévios.....	11
3.1.1. Preparação das amostras .....	11
3.1.2. Análise Microbiológica .....	12
3.1.3. Análise por Espectroscopia de Infravermelho Médio .....	13
3.2. Ensaaios com amostras de fiambre embalado e fresco.....	15
3.2.1. Preparação das amostras .....	15
3.2.2. Análise microbiológica .....	16
3.2.3. Análise por espectroscopia de Infravermelho Médio .....	17
3.2.4. Análise de Componentes Principais (PCA).....	17
3.3. Obtenção de espectros de colónias de microrganismos.....	17
3.3.1. Preparação das amostras .....	17
3.3.2. Análise por espectroscopia de Infravermelho Médio .....	18
4. Resultados e discussão .....	19
4.1. Ensaaios prévios.....	19
4.2. Ensaaios com amostras de fiambre embalado e fresco.....	31
4.3. Obtenção de espectros de colónias de microrganismos.....	50
5. Conclusões .....	53
6. Referências bibliográficas .....	55

## Listagem de Figuras:

Figura 1: Esquema do interferómetro de Michelson (Adaptado de Stuart, 2004). .....	8
Figura 2: Conjunto das médias dos espectros de fiambre (medição directa de fatias de 0,5 cm), para cada um dos tempos, relativos a cada uma das marcas de fiambre analisadas (A e B), adquiridas no local 1. ....	20
Figura 3: Conjunto das médias dos espectros de fiambre (medição directa de fatias de 0,5 cm), para cada um dos tempos, relativos a cada uma das marcas analisadas (A e B), adquiridas no local 2. ....	20
Figura 4: Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) para o fiambre medido directamente (fatias de 0,5 cm de espessura) correspondente à marca A e local 1, analisado aos dias 0, 4, 8, 12 e 16.....	21
Figura 5: Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) para o fiambre medido directamente (fatias de 0,5 cm de espessura) correspondente à marca B e local 1, analisado aos dias 0, 4, 8, 12 e 16.....	22
Figura 6: Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) para o fiambre medido directamente (fatias de 0,5 cm de espessura) correspondente à marca A e local 2, analisado aos dias 0, 4, 8, 12 e 16.....	22
Figura 7: Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) para o fiambre medido directamente (fatias de 0,5 cm de espessura) correspondente à marca B e local 2, analisado aos dias 0, 4, 8, 12 e 16.....	23
Figura 8: Variação do número de unidades formadoras de colónias por grama de fiambre ao longo do tempo, para cada um dos locais e cada uma das marcas analisadas. ....	23
Figura 9: Conjunto das médias dos espectros de fiambre homogeneizado em soluto de Ringer (1:10), para cada um dos tempos analisados. ....	25
Figura 10: Conjunto das médias dos espectros de fiambre fatiado (0,1 cm de espessura), para cada um dos tempos de análise. ....	26
Figura 11: Conjunto das médias dos espectros de fiambre, para cada um dos tempos, obtidos através da medição da camada superficial do fiambre utilizando o método 1. ....	27
Figura 12: Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) para as amostras de fiambre obtidas pela medição da camada superior através do método 1 (Espátula de alumínio), nos tempos de análise T0, T2 e T4. ....	28
Figura 13: Conjunto das médias dos espectros de fiambre, obtidos através da medição da camada superficial do mesmo utilizando o método 2, para cada um dos tempos, relativos à marca A.....	29
Figura 14: Conjunto das médias dos espectros de fiambre, para cada um dos tempos, relativos à marca B. ....	29
Figura 15: Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais relativo à medição da camada superficial pelo método 2, marca A, analisado nos dias 0, 4 e 8.....	30
Figura 16: Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais relativo à medição da camada superficial pelo método 2, marca B, analisado no dia 0, 4 e 8. ....	30
Figura 17: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC4) relativo aos vários tipos de fiambre analisados (porco, peru e frango), da marca A. ....	32



Figura 18: Mapa das contribuições factoriais (PC1 vs PC4) relativo aos vários tipos de fiambre analisados, marca A.....	32
Figura 19: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC2) aos dias 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de porco, marca A.....	33
Figura 20: Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) relativo a fiambre embalado de porco, marca A.....	34
Figura 21: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1) aos dias 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de frango, marca A.....	34
Figura 22: Mapa das contribuições factoriais (PC1) relativo a fiambre embalado de frango, marca A.....	35
Figura 23: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) aos dias 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de peru, marca A.....	35
Figura 24: Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC3) relativo a fiambre embalado de peru, marca A.....	36
Figura 25: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) relativo aos vários tipos de fiambre, marca B.....	36
Figura 26: Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC3) relativo aos vários tipos de fiambre embalado, marca B.....	37
Figura 27: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC2) aos dias 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de porco, marca B.....	37
Figura 28: Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) relativo a fiambre embalado de porco, marca B.....	38
Figura 29: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1) ao tempo 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de frango, marca B.....	38
Figura 30: Mapa das contribuições factoriais (PC1) relativo a fiambre embalado de frango, marca B.....	39
Figura 31: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) aos dias 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de peru, marca B.....	39
Figura 32: Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC3) relativo a fiambre embalado de peru, marca B.....	40
Figura 33: Unidades formadoras de colónias por grama de fiambre, para cada um dos tempos de análise, para cada marca e tipo de fiambre. FA – fiambre de frango da marca A; FB – fiambre de frango da marca B; PeA – fiambre de peru da marca A; PeB – fiambre de peru da marca B; PoA – fiambre de porco da marca A; PoB – fiambre de porco da marca B.....	41
Figura 34: Espectro de fiambre fresco da marca A dividido por um espectro de água (A); espectro de fiambre embalado da marca A dividido por um espectro de água (B) e uma sobreposição dos dois espectros (C).....	42
Figura 35: Exemplo de uma placa com colónias típicas de bacilos referente a uma amostra de fiambre embalado.....	43
Figura 36: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) relativos às duas marcas de fiambre analisadas.....	44
Figura 37: Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC3) relativos às duas marcas de fiambre analisadas.....	44
Figura 38: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) relativo a fiambre fresco, dias 0, 2, 4, 6 e 8, marca A.....	45

Figura 39: Mapa das contribuições (PC1 e PC3) relativo a fiambre fresco, dias 0, 2, 4, 6 e 8, marca A.....	45
Figura 40: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC2) relativo a fiambre fresco, dias 0, 1 e 2, marca A. Os dados foram previamente tratados com a 1ª derivada. ....	46
Figura 41: Mapa das contribuições factoriais (PC1 vs PC2) relativo a fiambre fresco, dias 0, 1 e 2, marca A. ....	47
Figura 42: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) relativas a fiambre fresco, para os dias 0, 2, 4, 6 e 8, marca B.....	48
Figura 43: Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC3) relativas a fiambre fresco, para os dias 0, 2, 4, 6 e 8, marca B. ....	48
Figura 44: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC2) relativo a fiambre fresco, dias 0, 1 e 2, marca B. Os dados foram previamente tratados com a 1ª derivada. ....	49
Figura 45: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) relativo a fiambre fresco, dias 0, 1 e 2, marca A. Os dados foram previamente tratados com a 1ª derivada. ....	49
Figura 46: Unidades formadoras de colónias para os vários tempos analisados, para fiambre fresco, marca A e B. ....	50
Figura 47: Espectros de infravermelho de 5 colónias distintas de bactérias, na zona de 2000 a 800 cm <sup>-1</sup> . ....	50
Figura 48: Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) relativo a 5 colónias obtidas a partir de fiambre envelhecido à temperatura ambiente.....	51
Figura 49: Mapa das contribuições factoriais (PC1 vs. PC2) relativo a 5 colónias obtidas a partir de fiambre envelhecido à temperatura ambiente. ....	52

## **Listagem de Tabelas:**

Tabela 1: Valores de absorção de diferentes grupos funcionais no infravermelho. .... 7

## **Abreviaturas:**

ATP – Adenosina trifosfato

ATR – Reflexão total atenuada

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FT-IR – Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

PC – Componente principal

PCA (análise multivariada) – Análise de componentes principais

PCA (meio de cultura) – “Plate count agar”

UFC – Unidades formadoras de colónias

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Os microrganismos e a alimentação**

Os alimentos que ingerimos raramente são estéreis, contendo uma grande variedade de microrganismos. Estes microrganismos fazem parte da flora natural do alimento ou podem ser adquiridos durante a sua colheita ou matança, processamento, armazenamento e distribuição.

Na maioria dos casos, a microflora presente num determinado alimento não é nociva e este pode ser ingerido sem qualquer consequência adversa. No entanto, é possível que os microrganismos se manifestem nos alimentos de várias formas, podendo causar deterioração destes, provocando doenças associadas ao seu consumo, ou transformando o alimento de uma forma benéfica através da fermentação.

O crescimento dos microrganismos nos alimentos depende das características químicas e físicas destes, bem como de factores extrínsecos como a temperatura e a humidade. Para assegurar que os alimentos sejam seguros e possam ser armazenados de forma satisfatória é necessário destruir os microrganismos presentes ou manipular os alimentos para que o crescimento microbiano seja evitado ou dificultado.

## **1.2. Contaminação de carnes processadas**

De entre os produtos alimentares, a carne é considerada um alimento de fácil deterioração, sendo classificada no grupo dos alimentos perecíveis. A grande quantidade de água e de nutrientes presentes na carne fazem deste alimento um meio excelente para o crescimento de microrganismos (Adams e Moss, 1995).

As carnes processadas compreendem os derivados de carne que são cozinhados, fumados ou curados. O fiambre é um destes produtos, sendo apresentado no mercado sob a forma de fiambre fresco, fiambre fumado, fiambre curado e fiambre fatiado. A microflora presente nos diferentes tipos de fiambre varia consoante o tipo de tratamento a que este alimento é sujeito. O fiambre fresco pode apresentar uma carga microbiana bastante diversa, sendo predominantes as bactérias gram-negativas. Entre as bactérias gram-positivas, os géneros *Enterococcus* e *Lactobacillus* são frequentemente encontrados em fiambres frescos, bem como alguns fungos como *Penicillium*, *Mucor* e *Cladosporium*. O fiambre curado e

fumado é sujeito a tratamentos adicionais que inactivam os microrganismos o fumo/calor e o cloreto de sódio. O fumo tem propriedades antimicrobianas que resultam da actividade de alguns dos compostos do fumo, sendo o calor empregue no processo responsável também pela diminuição do teor de microrganismos. O fiambre fumado é pouco susceptível a contaminação por bactérias, sendo que a forma mais comum de deterioração deste tipo de fiambre é o aparecimento de bolor, geralmente devido a *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* e *Penicillium*. No processo de cura o cloreto de sódio é o ingrediente principal. O sal evita o crescimento microbiano durante e após o processo de cura (Adams e Moss, 1995; Jay, 2000). Contudo, os produtos de carne curados, como o fiambre curado, além da adição de cloreto de sódio, são adicionados de outras substâncias que fazem parte das soluções de cura injectadas, que podem levar a deterioração posterior destes alimentos. Assim, o fiambre curado sofre uma deterioração diferente da que ocorre nos fiambres frescos ou fumados. Isto deve-se primeiramente aos açúcares presentes nas soluções de cura injectadas no fiambre, açúcares estes que são fermentados pela comunidade microbiana natural do fiambre. Microrganismos do género *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Micrococcus* e *Clostridium* são frequentemente encontrados em amostras de fiambre curado (Jay, 2000). Outros ingredientes frequentemente encontrados em fiambre curado e, principalmente, no que já se encontra fatiado, são os nitritos ou nitratos de sódio. Estes compostos, para além de ajudarem a manter o bom aspecto do produto, têm também propriedades antimicrobianas, afectando principalmente *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus*, embora não sejam eficazes contra *Enterobacteriaceae*. O fiambre fatiado pode ser embalado de várias formas, sendo as mais amplamente utilizadas a embalagem em vácuo ou sob atmosfera modificada. Na embalagem em vácuo é retirado todo o ar, prevenindo o contacto deste com o fiambre. A atmosfera modificada é produzida com uma mistura de dióxido de carbono, azoto e oxigénio. O dióxido de carbono tem um efeito inibitório do crescimento microbiano, o azoto tem uma baixa actividade da água o que previne o colapso da embalagem, enquanto o oxigénio ajuda a manter o bom aspecto do fiambre. Tanto a embalagem sob vácuo como a embalagem sob atmosfera modificada exercem o seu efeito principalmente através da inibição de microrganismos de crescimento rápido que, de outra forma, iriam deteriorar rapidamente os produtos alimentares. Microrganismos anaeróbios obrigatórios e facultativos como *Enterobacteriaceae* são menos afectados. Assim sendo, é sempre necessário manter os produtos em ambiente refrigerado (Adams e Moss, 1995).

Os produtos de carne, nomeadamente o fiambre, consideram-se deteriorados quando há uma mudança nas suas propriedades organolépticas, o que faz com que o alimento seja

rejeitado pelo consumidor. Estas mudanças incluem alterações no aspecto, no odor e no sabor do produto alimentar (Jay, 2000). É geralmente aceite que quando existe alteração das propriedades organolépticas de um alimento, esta é devida à decomposição e formação de metabolitos causados pelo crescimento de microrganismos (Nychas e Tassou, 1997).

### **1.3. Métodos tradicionais para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos**

A análise microbiológica dos alimentos baseia-se na avaliação da presença/ausência de microrganismos, na determinação do número de microrganismos e/ou dos seus produtos e na identificação de alguns microrganismos. Nenhum dos métodos actualmente utilizados permite determinar o número exacto de microrganismos presentes num determinado alimento. Os métodos utilizados para a contagem do número total de microrganismos permitem obter uma indicação acerca da qualidade microbiológica de um alimento, sendo, por isso, frequentemente utilizados. O método mais utilizado para determinar o número total de microrganismos num produto alimentar é a contagem em placa do número de unidades formadoras de colónias (UFC) que detecta apenas a fracção de microrganismos cultiváveis. Para proceder à contagem de UFC em placa é necessário homogeneizar as amostras do produto alimentar e diluí-las num diluente apropriado. Após diluição, as amostras são semeadas em meio de cultura agarizado e incubadas geralmente a 22°C durante 5 dias ou a 37°C durante 3 dias. Após a incubação é contado o número de colónias. Este procedimento é demorado e trabalhoso, sendo necessários alguns dias para obter os resultados. Muitas vezes é ainda necessário identificar quais os microrganismos presentes num dado alimento, sendo utilizados meios de cultura selectivos e/ou diferenciais e as colónias isoladas, muitas vezes, são ainda submetidas a testes de confirmação. Estes processos são dispendiosos e muito demorados, sendo assim importante desenvolver técnicas mais rápidas e económicas para fazer face às exigências da indústria alimentar (Adams e Moss, 1995; Jay, 2000).

#### **1.4. Métodos rápidos para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos**

Uma vez que os métodos tradicionais utilizados para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos requerem algum tempo, muitas vezes é necessário recorrer a métodos mais rápidos, pois se um alimento se encontrar contaminado por um microrganismo patogénico é fundamental detectá-lo atempadamente para evitar a transmissão de infecções e/ou intoxicações alimentares (Irudayaraj *et al.* 2002).

Os métodos rápidos de avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos consistem na modificação de um método microbiológico de forma a diminuir o tempo de resposta. Estes métodos devem eliminar os vários passos de crescimento inerentes aos métodos tradicionais e fornecer especificidade e sensibilidade necessárias para a detecção e distinção de baixos teores de células numa matriz complexa. Contudo, os métodos rápidos requerem meios de enriquecimento da amostra, testes de confirmação por métodos clássicos para os resultados positivos, alguns métodos têm interferências (microrganismos nativos do próprio alimento, ingredientes, aditivos e conservantes), geralmente têm apenas um único alvo (microrganismo ou toxina), podem tornar-se dispendiosos e complexos de executar, requerem calibração, validação mas são, de um modo geral, mais sensíveis do que os métodos tradicionais.

Os métodos rápidos baseiam-se em técnicas microbiológicas, químicas, bioquímicas, biofísicas, serológicas, imunológicas e genéticas. Estes métodos incluem a redução de corantes (como o azul de metileno), actividade enzimática, testes bioquímicos miniaturizados, modificações de métodos microbiológicos convencionais (sementeiras modificadas e meios de cultura adicionados), métodos bioluminescentes (bioluminescência ATP e bacteriana), métodos imunológicos (ELISA), testes de aglutinação, imunoprecipitação, biossensores, sistemas eléctricos e citometria de fluxo (Rangel, 1999; Patel, 2005). A espectroscopia de infravermelho, já bastante usada em várias áreas da indústria alimentar, apresenta potencial para ser utilizada como método rápido para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos.



### 1.5. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho tem sido adoptada como uma ferramenta analítica em várias áreas, tendo superado, em vários casos, os métodos tradicionais. As principais razões para a sua grande aceitação são a rapidez com que as amostras podem ser caracterizadas quase sem manipulação e a flexibilidade do equipamento (Blanco e Villarroya, 2002).

A espectroscopia de infravermelho é um método de análise bastante rápido e não invasivo que se baseia na observação das vibrações de moléculas que são excitadas por um feixe de radiação na zona do infravermelho (Cordella *et al.* 2002). Actualmente, esta é uma das técnicas analíticas mais promissoras. Uma das grandes vantagens da espectroscopia de infravermelho é a de que, supostamente, pode ser estudada qualquer amostra em qualquer estado (Stuart, 2004).

O espectro de absorvância do infravermelho representa um “fingerprint” que é característico de uma substância química ou biológica. Duas substâncias com espectros de infravermelho idênticos representam, quase de certeza, o mesmo composto (Cordella *et al.* 2002).

Os dados obtidos através da espectroscopia de infravermelho são muito complexos, pelo que após a sua obtenção é necessário recorrer à quimiometria, de forma a extrair a maior quantidade de informação possível dos mesmos. A informação analítica dos espectros pode ser interpretada recorrendo a uma análise multivariada, que relaciona os espectros obtidos com as propriedades do objecto de estudo, facilitando assim a interpretação dos dados. A análise multivariada apresenta diversas ferramentas de análise, sendo assim necessário seleccionar a ferramenta adequada para cada caso. Os dados são raramente usados na sua forma original, sendo que os espectros são geralmente transformados antes da análise multivariada (Brereton, 2003).

A análise de componentes principais (PCA) é um método simples e não paramétrico que permite identificar padrões em dados, conseguindo destacar as semelhanças e diferenças entre as amostras analisadas. A PCA possibilita a extracção de informação relevante de conjuntos de dados complexos. Esta análise permite comprimir os dados sem que se perca a variabilidade dos mesmos (Shlens, 2009). Cada fonte de variabilidade é concretizada na obtenção de um eixo (componente principal – PC). Em termos geométricos, pode ser compreendida como uma rotação/projecção dos eixos do espaço multivariado de uma matriz, de forma a maximizar a variação ao longo de cada eixo. Em termos matemáticos, o processo

consiste numa transformação linear das variáveis de partida de modo a criar variáveis características (componentes principais) das fontes de variabilidade. Como técnica exploratória, permite a visualização dos dados após a projecção das amostras no espaço multidimensional determinado pelos componentes principais, sendo que cada um deles está associada uma percentagem de variância (Jolliffe, 1986 e Almeida, 2006).

Ao relacionar os diagramas das coordenadas factoriais com os mapas das contribuições factoriais obtidos neste tipo de análise, conseguem estudar-se os comportamentos das amostras com as variáveis que têm maior importância em cada componente principal. São estas dimensões que maximizam a variabilidade entre as amostras, sendo desprezadas outras dimensões que podem conter apenas variabilidade devida ao ruído ou não informativa (Jolliffe, 1986).

#### **1.5.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier**

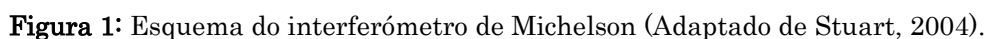
Os espectrómetros de infravermelho começaram a ser comercializados na década de 40 e desde então sofreram vários aperfeiçoamentos. Um dos avanços mais significantes adveio da introdução de espectrómetros de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR). Este tipo de instrumento emprega um interferómetro e explora o processo matemático da transformação de Fourier (Stuart, 2004). A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier é baseada na interacção da luz de infravermelho com a matéria (Smith, B. 1996). Este tipo de espectrómetros veio melhorar grandemente a qualidade dos espectros de infravermelho e minimizar o tempo requerido para a obtenção dos dados (Stuart, B. 2004).

A radiação no infravermelho é dividida em três tipos: infravermelho longínquo (50 – 1000  $\mu\text{m}$ ), infravermelho médio (2,5 – 50  $\mu\text{m}$ ) e infravermelho próximo (0,70 – 2,5  $\mu\text{m}$ ), sendo esta última a mais utilizada em química alimentar. Cada grupo funcional diferente absorve radiação em certas frequências, originando bandas de absorção características (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores de absorção de diferentes grupos funcionais no infravermelho (adaptado de Stuart, 2004).

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo Funcional
3640 – 3610	O-H (livre)
3500 – 3070	N-H
2960 – 2850	C-H alifáticos
1750 – 1740	C=O de ésteres (gordura)
1740 – 1720	C=O de aldeídos
1720 – 1700	C=O de cetonas
1675 – 1645	C=C
≈1650	Amida I
1590 – 1550	NH <sub>2</sub>
≈1550	Amida II
1470 – 1430	CH <sub>2</sub>
1390 – 1370	CH <sub>3</sub>
1420 e 1300 – 1200	C-O de ácidos carboxílicos
1300 – 1020	C-O de ésteres
1200 – 1050	C-O de álcoois e fenóis
1155 – 1150	C-O de hidratos de carbono
1024 – 998	C-OH de hidratos de carbono

Os espectrómetros de infravermelho são geralmente baseados no interferómetro de Michelson, desenhado em 1891 (Figura 1).



A utilização da transformada de Fourier tem diversas vantagens, entre as quais permitir uma fácil manipulação dos dados pois estes sofrem conversão analógico-digital. Além disso, o ruído dos espectros é diminuído e a sua resolução é elevada (Silverstein *et al*, 2003).

8

espectros tem o inconveniente de ser necessário controlar a espessura da amostra (Stuart, 2004).

As técnicas de reflexão são utilizadas quando as amostras são difíceis de analisar pelos métodos de transmissão convencionais. A técnica de ATR é comumente utilizada no infravermelho próximo para obtenção de espectros de absorção de filmes pouco espessos e substâncias opacas (Hollas, 2004). Esta técnica utiliza o fenómeno de reflexão interna total. O feixe que penetra um cristal sofre uma reflexão interna total quando o ângulo de incidência na interface entre a amostra e o cristal for superior ao ângulo crítico, sendo esta uma função dos índices de refração de duas superfícies. O feixe penetra uma gama de comprimento de onda além da superfície reflectora e quando o material que absorve selectivamente a radiação está em estreito contacto com essa superfície reflectora, o feixe perde energia no comprimento de onda em que o material absorve. Mede-se a radiação atenuada resultante, sendo usada pelo espectrómetro como uma função de comprimento de onda, dando assim as características espectrais de absorção da amostra (Stuart, 2004).

### **1.5.2. Aplicações da Espectroscopia de Infravermelho na análise de alimentos**

A espectroscopia de infravermelho próximo e médio, aliada à utilização de uma análise multivariada dos dados, tem mostrado ser bastante útil na indústria alimentar. É um método pouco dispendioso, pois o custo inerente é praticamente apenas o da aquisição do aparelho (Stuart, 2004).

Este método provou ser bastante vantajoso em estudos de qualidade e composição de diversos alimentos, bem como de adulterações dos mesmos. Estudos onde se analisaram os teores de diferentes açúcares (glucose, frutose e sacarose) em sumos de fruta mostraram que a espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier permite detectar diferenças entre todos os tipos de açúcar, bem como os níveis em que estes se encontravam presentes nas bebidas (Rodrigues-Saona *et al.*, 2001). Outros estudos mostram que este método possibilita a detecção de potenciais adulterações em óleos, chocolate, produtos de chocolate e bolos (Che Man *et al.*, 2005; Syahariza *et al.*, 2005; Vlachos *et al.* 2006).

No que respeita a produtos de carne, existem estudos onde a espectroscopia de infravermelho próximo foi utilizada com sucesso na previsão da composição de carnes de diferentes proveniências (Viljoen *et al.* 2005) e até para prever a cor e textura em fiambre (Garcia-Rey *et al.*, 2005). A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

foi também utilizada com sucesso na detecção da deterioração microbiológica em carne através da medição das alterações bioquímicas do substrato (Ellis *et al.*, 2002). Além disso, a espectroscopia de infravermelho já provou também ser uma ferramenta valiosa e rápida na detecção e distinção de células microbianas na superfície de alimentos (Irudayaraj *et al.* 2002), bem como na classificação bactérias de diferentes níveis taxonómicos sem que seja necessária uma pré-selecção de estirpes (Helm *et al.*, 1990). A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier tem mostrado ter sensibilidade para diferenciar colónias bacterianas, podendo mesmo detectar diferenças na própria colónia (Choo-Smith *et al.*, 2001) Existem ainda estudos que sugerem que o FT-IR pode ser usado como método de rastreabilidade, podendo ser utilizado para identificar produtos alimentares e determinar quais as suas origens e métodos de produção (Cozzolino e Murray, 2004; García-Rey *et al.*, 2005).

## **1.6. Objectivos**

O objectivo deste trabalho foi testar o potencial da espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier como método rápido para avaliar a qualidade microbiológica do fiambre. Esta tecnologia foi ainda utilizada para distinguir as várias marcas e tipos de fiambre analisados neste estudo. Os objectivos específicos foram:

- Detectar alterações no fiambre ao longo do tempo devido à presença de microrganismos;
- Distinguir diferentes tipos de colónias crescidas à superfície do fiambre.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Ensaaios prévios**

Numa primeira fase do trabalho foram efectuados vários testes de modo a perceber qual a melhor forma de analisar o fiambre através da espectroscopia de infravermelho médio, uma vez que se trata dum alimento heterogéneo, o que dificulta a obtenção de espectros representativos.

#### **2.1.1. Preparação das amostras**

- Medição directa do fiambre (fatias de 0,5 cm):

Adquiriram-se fatias de 2 marcas (A e B) de fiambre de porco (fiambre da perna), em 2 locais diferentes, cada uma com 0,5 cm de espessura. O fiambre foi cortado com um cortador circular de 2 cm de diâmetro em condições assépticas. Foram usadas 2 rodela de fiambre por amostra: uma foi usada para a medição no espectrómetro de infravermelho (FT-IR-ATR, Perkin Elmer Spectrum BX) e a outra para análise microbiológica. As fatias foram guardadas em placas de Petri, a 4°C, durante todo o trabalho experimental, que decorreu durante 16 dias. Foi ainda determinado o peso médio (Mettler Toledo AB104,  $\pm 0,0001\text{g}$ ) das rodela de fiambre (5 rodela de cada), para posterior determinação das unidades formadoras de colónias por grama de fiambre (UFC) na análise microbiológica. As rodela utilizadas para determinar o peso não foram usadas nos ensaios para evitar contaminação.

- Medição do fiambre homogeneizado:

Adquiriu-se uma fatia de fiambre de porco (fiambre da perna) da marca A com 0,5 cm de espessura. Foram cortados círculos de fiambre com um cortador de 2 cm de diâmetro, em condições de assépsia. As fatias foram guardadas em placas de Petri à temperatura ambiente (cerca de 20°C), tendo a experiência decorrido durante 3 dias. Cada círculo de fiambre foi

homogeneizado em Soluto de Ringer (Merck) numa razão de 1:10, com um ultra-turrax (T25, Janke & Kunkel – IKA Labortechnik), na altura da medição no FT-IR .

- Medição directa do fiambre (fatias de 0,1 cm):

Adquiriram-se fatias de fiambre de porco (fiambre da perna) da marca A com 0,1 cm de espessura e colocaram-se pedaços de cerca de 6 x 6 cm em caixas de Petri, em condições de assepsia. As placas foram guardadas à temperatura ambiente (cerca de 20°C), para posterior análise no FT-IR .

- Medição na camada superficial do fiambre (método 1 e método 2):

Adquiriram-se fatias de fiambre de porco (fiambre da perna) da marca A com 0,5 cm de espessura que foram cortadas em pedaços de cerca de 6 x 6 cm e guardadas em placas de Petri, à temperatura ambiente (cerca de 20°C), para posterior análise no FT-IR.

### **2.1.2. Análise Microbiológica**

Foi realizada uma análise microbiológica aos lotes de fiambre preparados de acordo com a descrição apresentada para o primeiro ensaio prévio, medição directa de fiambre (0,5 cm de espessura). Cada uma das rodela de fiambre foi homogeneizada com o ultra-turrax (T25, Janke & Kunkel – IKA Labortechnik) com Soluto de Ringer (Merck), em condições de assépsia. Semeou-se em duplicado 1 mL de cada sub-amostra diluída em Soluto de Ringer, por incorporação em meio de cultura Plate Count Agar (PCA, Merck). As placas foram incubadas numa estufa a 37°C (Nuair IR autoflow) durante 3 dias. Após incubação foram contadas as unidades formadoras de colónias (UFC) na diluição mais adequada e determinou-se a concentração por grama de fiambre. Foram efectuadas análises microbiológicas aos 0, 4, 8, 12 e 16 dias após preparação das amostras.



### **2.1.3. Análise por Espectroscopia de Infravermelho Médio**

- Medição directa do fiambre (fatias de 0,5 cm):

A análise espectroscópica das amostras foi efectuada diariamente, num espectrómetro de infravermelho (FT-IR-ATR, Perkin Elmer Spectrum BX), com uma resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$  e 32 varrimentos, na região do infravermelho médio (zona entre  $4000$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ ). Foram efectuadas 5 medições para cada uma das amostras de fiambre. O fiambre foi colocado directamente no acessório de amostragem do aparelho para obter os espectros correspondentes.

- Medição do fiambre homogeneizado:

A análise espectroscópica das amostras foi efectuada diariamente num espectrómetro de infravermelho (FT-IR-ATR, Perkin Elmer Spectrum BX.), com uma resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$  e 32 varrimentos, na região do infravermelho médio (zona entre  $4000$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ ). Foram efectuadas 5 medições para cada uma das amostras de fiambre. Colocou-se no acessório de amostragem uma gota de fiambre homogeneizado em Sóluto de Ringer (1:10) para obter os espectros correspondentes.

- Medição directa do fiambre (fatias de 0,1 cm):

A análise espectroscópica das amostras foi efectuada diariamente, num espectrómetro de infravermelho (FT-IR-ATR, Perkin Elmer Spectrum BX) com uma resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$  e 32 varrimentos, na região do infravermelho médio (zona entre  $4000$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ ). Foram efectuadas 5 medições para cada amostra de fiambre. O fiambre foi colocado directamente no acessório de amostragem do aparelho, pressionado as amostras com uma força constante, para obter os espectros correspondentes.

- Obtenção de espectros da camada superficial do fiambre (método 1):

A análise espectroscópica das amostras foi efectuada no FT-IR (Perkin Elmer Spectrum BX) com uma resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$  e 32 varrimentos, na região do infravermelho médio (zona

entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$ ), de 12 em 12 horas, perfazendo um total de 5 medições. Foram realizados 5 espectros para cada amostra de fiambre. A camada superficial do fiambre foi raspada e homogeneizada com uma espátula de alumínio e uma pequena porção foi colocada directamente no acessório de amostragem.

- Obtenção de espectros da camada superficial do fiambre (método 2):

A análise espectroscópica das amostras foi efectuada no FT-IR (Perkin Elmer Spectrum BX) com uma resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varrimentos, na região do infravermelho médio (zona entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$ ), de 24 em 24 horas, perfazendo um total de 9 medições. Foram realizados 5 espectros em cada medição. A camada superficial do fiambre foi raspada e homogeneizada com uma vareta de vidro (ponta arredondada) e foi colocada uma pequena porção directamente no acessório de amostragem.

#### **2.1.4. Análise de Componentes Principais (PCA)**

O software utilizado para a visualização dos espectros foi o OPUS (versão 2.06). Os dados relativos aos ensaios prévios foram tratados por análise multivariada, após pré-tratamento dos mesmos (centrar e padronizar por linhas e centrar por colunas) e aplicação da primeira derivada calculada com base no procedimento de Savitsky-Golay, através de um programa desenvolvido no Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Foi escolhida a combinação de componentes principais ou o componente principal mais favoráveis para a separação/agrupamento das amostras em cada um dos casos. Os gráficos foram feitos no Microsoft Excel 2007.

## **2.2. Ensaios com amostras de fiambre embalado e fresco**

Após realização dos ensaios prévios, chegou-se à conclusão de que a melhor maneira de obter os espectros para conseguir detectar alterações nas comunidades microbiológicas do fiambre é conseguida através da medição na camada superficial (líquido superficial) do fiambre obtida com uma vareta de vidro, pois os espectros mostraram ser suficientemente homogêneos para proceder à análise multivariada dos mesmos e tentar detectar alterações na flora microbiana ao longo do tempo. Verificou-se também que a partir de 9/10 dias após preparação das amostras o fiambre colocado a 4°C começava a apresentar colónias visíveis a olho nu, pelo que se decidiu realizar experiências com uma duração de apenas 8 dias. Foi analisado fiambre pré-embalado e fiambre fresco e foi ainda realizado um pequeno estudo utilizando colónias de bactérias crescidas à superfície de fiambre.

### **2.2.1. Preparação das amostras**

#### Fiambre embalado:

Foram analisadas duas marcas de fiambre embalado de porco (da perna), de peru e de frango com datas de validade semelhantes. Para cada amostra de fiambre foram sobrepostas as fatias em condições de assépsia (até formar um conjunto com aproximadamente 0,5 cm de espessura, o que equivaleu a cerca de 5 rodela de cada), cortados círculos com um cortador com 2 cm de diâmetro e colocados 2 conjuntos de rodela em cada placa de Petri, uma rodela para a análise microbiológica e outra para a análise no FT-IR. Foram analisadas 5 réplicas de cada uma das amostras de cada marca, para cada tipo de fiambre. As placas foram colocadas numa câmara fria, a 4°C, até à sua análise. O ensaio decorreu durante 9 dias. A análise microbiológica foi realizada de 2 em 2 dias e a análise no FT-IR foi efectuada de 24 em 24 horas. Para avaliar a concentração de bactérias no fiambre foi necessário determinar o peso médio do conjunto das rodela de fiambre para os diferentes tipos e marcas (5 rodela para cada um), recorrendo-se a uma balança (Mettler Toledo  $\pm 0,0001$ g). As rodela utilizadas para determinar o peso não foram utilizadas nas análises microbiológicas.

### Fiambre fresco:

Foram analisadas duas marcas de fiambre de porco da perna. Para cada amostra de fiambre, foram adquiridas fatias de 0,5 cm de diâmetro, que foram cortados em círculos com um cortador com 2 cm de diâmetro e colocada uma rodela em cada placa de Petri para a análise microbiológica. Para análise no FT-IR, foram preparadas placas de Petri com fatias de 6 x 6 cm (por forma a aumentar a área de superfície para melhor se conseguir recolher o líquido superficial com uma vareta de vidro, uma vez que o fiambre fresco se apresentava mais “seco” que o embalado). As placas foram colocadas numa câmara fria, a 4°C, até à sua análise. O ensaio decorreu durante 9 dias. A análise microbiológica foi realizada de 2 em 2 dias e a análise no FT-IR foi efectuada de 24 em 24 horas. Para avaliar a concentração de bactérias no fiambre foi necessário determinar o peso médio das rodela de fiambre para os diferentes tipos e marcas (5 rodela de cada um), recorrendo-se a uma balança (Mettler Toledo  $\pm 0,0001\text{g}$ ). As rodela utilizadas para determinar o peso não foram utilizadas nas análises microbiológicas.

### **2.2.2. Análise microbiológica**

#### Fiambre embalado e fiambre fresco:

A análise microbiológica foi realizada de 2 em 2 dias, aos 0, 2, 4, 6 e 8 dias após preparação das amostras, tanto para o fiambre embalado como para o fiambre fresco. Cada rodela de fiambre destinada à análise microbiológica foi homogeneizada com um ultra-turrax (T25, Janke & Kunkel – IKA Labortechnik) em Sóluto de Ringer (Merck) numa razão de 1:10. Foi efectuada sementeira em duplicado por incorporação com meio de cultura PCA (Merck). Após incubação a 37°C (Nuair IR autoflow) durante 3 dias foi determinado o número de UFC  $\text{g}^{-1}$  de cada amostra de fiambre.

### **2.2.3. Análise por espectroscopia de Infravermelho Médio**

#### Fiambre embalado e fiambre fresco:

A análise espectroscópica das amostras foi efectuada no FT-IR (Perkin Elmer Spectrum BX) com uma resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$  e 32 varrimentos, na região do infravermelho médio (zona entre  $4000$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ ), de 24 em 24 horas, perfazendo um total de 9 medições. Foram obtidos 5 espectros em cada medição. A camada superficial do fiambre foi raspada e bem misturada com uma vareta de vidro e foi colocada uma pequena porção directamente no acessório de amostragem.

### **2.2.4. Análise de Componentes Principais (PCA)**

O software utilizado para a visualização dos espectros foi o OPUS (versão 2.06). Os dados foram tratados por análise multivariada, após pré-tratamento dos mesmos (centrar e padronizar por linhas e centrar por colunas) e aplicação da primeira derivada baseada no procedimento de Savitsky-Golay (quando necessário), através de um programa desenvolvido no Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Foi escolhida a combinação de componentes principais e zona do espectro mais favoráveis para a separação/agrupamento das amostras em cada um dos casos. Os gráficos foram feitos no Microsoft Excel 2007.

## **2.3. Obtenção de espectros de colónias de microrganismos**

### **2.3.1. Preparação das amostras**

Adquiriu-se uma fatia de  $0,5\text{ cm}$  de espessura de fiambre de porco (fiambre da perna) e deixou-se envelhecer a mesma à temperatura ambiente (cerca de  $20^{\circ}\text{C}$ ) durante 5 dias, em condições de assépsia. Ao fim deste tempo já eram visíveis várias colónias de microrganismos de diferentes aspectos.

### **2.3.2. Análise por espectroscopia de Infravermelho Médio**

A análise espectroscópica das amostras foi efectuada no FT-IR (Perkin Elmer Spectrum BX) com uma resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$  e 32 varrimentos, na região do infravermelho médio (zona entre  $4000$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ ). Foram obtidos 3 espectros de cada colónia a analisar. A amostra foi raspada com uma espátula e colocada directamente no acessório de amostragem do aparelho.

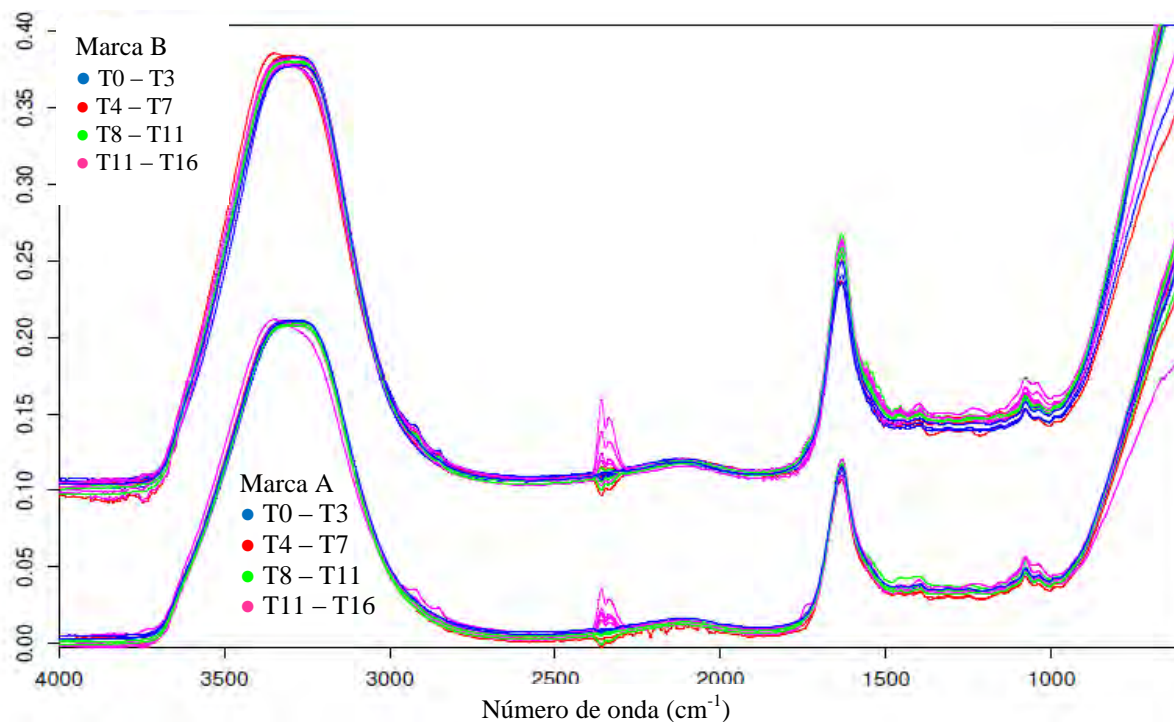
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Ensaios prévios

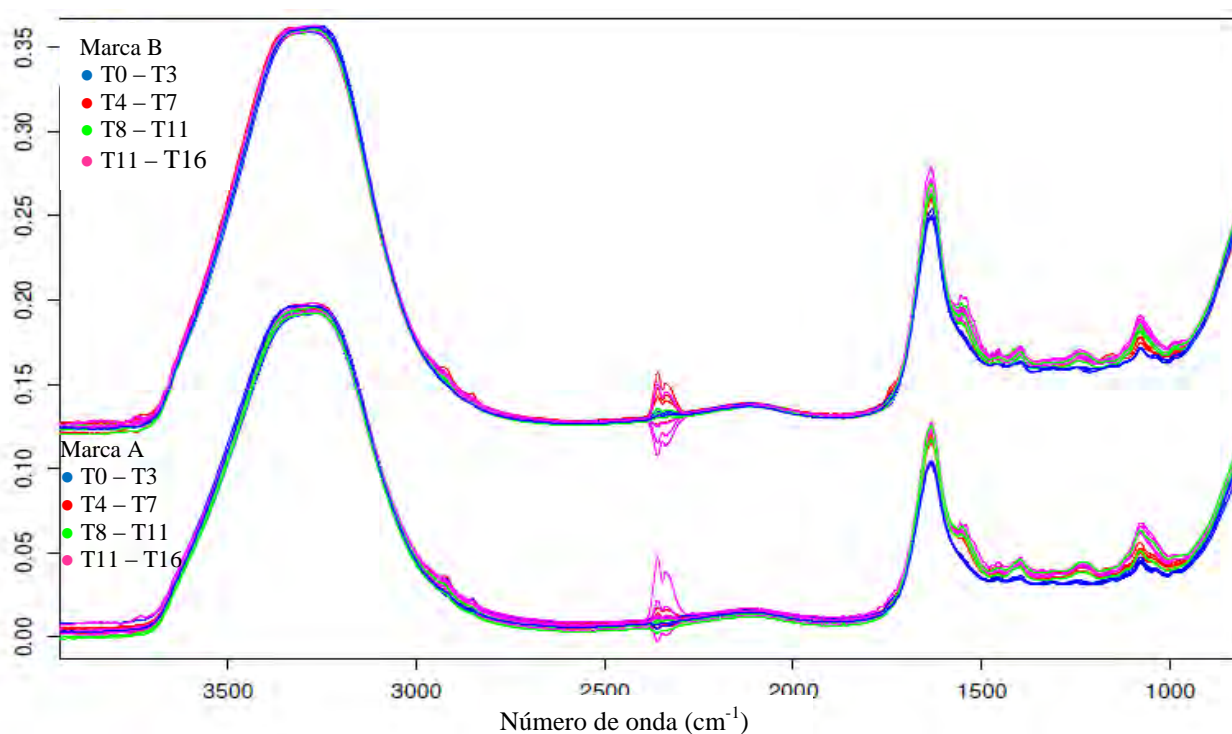
##### Medição directa do fiambre (fatias de 0,5 cm):

Os espectros das várias amostras do mesmo tempo de análise foram demasiado diferentes entre si neste estudo, especialmente para as amostras adquiridas no local 1, possivelmente devido à falta de reprodutibilidade na colocação das amostras no acessório de amostragem. Para além disso, em várias situações, os espectros obtidos apresentavam demasiado ruído. A existência de amostras de alimentos heterogéneas tem sido relatada como sendo um impedimento à análise por FT-IR, pelo que nas situações em que a homogeneização da amostra não é possível pode ser necessário recorrer a outros métodos de análise (Thygesen *et al.* 2003). A existência de espectros ruidosos pode ser devida a inúmeros factores que não são facilmente controláveis, como por exemplo flutuações na fonte de luz ou na luz de fundo do compartimento onde se encontra o aparelho ou mesmo variações de temperatura (Manning e Griffiths, 1997).

A figura 2 representa a totalidade das médias dos espectros de infravermelho, para cada um dos tempos de análise, obtidos a partir da medição directa de fiambre com a espessura de 0,5 cm, obtido no Local 1, para ambas as marcas analisadas. Observando os espectros das médias, não existe nenhum “padrão” visível que leve a diferenciar os vários tempos de envelhecimento do fiambre, sendo que acontece o mesmo para o Local 2, como se verifica na figura 3. Observa-se também que os espectros médios das amostras relativas ao local 1 são mais heterogéneos do que os do local 2. Apesar de se tratar das mesmas marcas nos dois locais, o facto de no local 2 os espectros serem mais homogéneos talvez se deva a diferenças na textura do fiambre, o que pode acontecer se os fiambres pertencerem a lotes diferentes ou se a embalagem tiver sido aberta em alturas diferentes, provocando alterações no fiambre.



**Figura 2:** Conjunto das médias dos espectros de fiambre (medição directa de fatias de 0,5 cm), para cada um dos tempos, relativos a cada uma das marcas de fiambre analisadas (A e B), adquiridas no local 1.

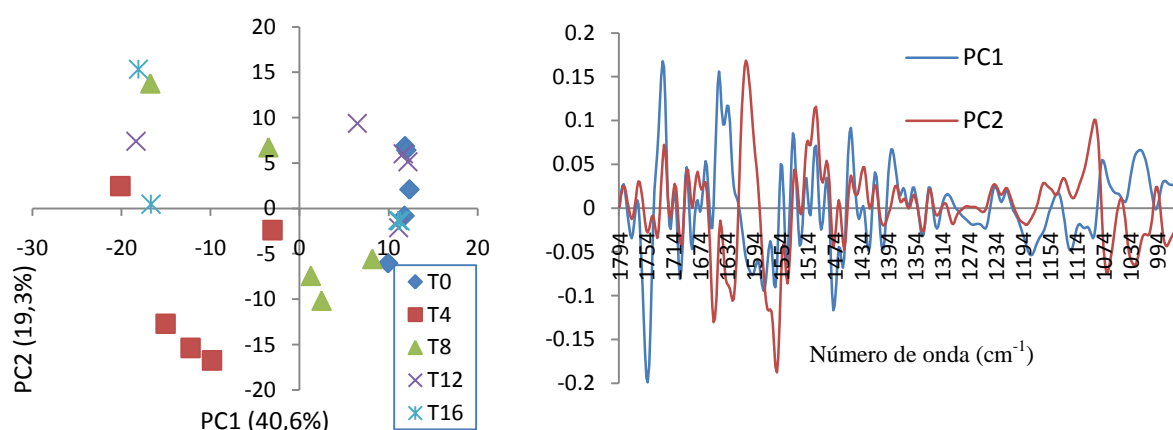


**Figura 3:** Conjunto das médias dos espectros de fiambre (medição directa de fatias de 0,5 cm), para cada um dos tempos, relativos a cada uma das marcas analisadas (A e B), adquiridas no local 2.

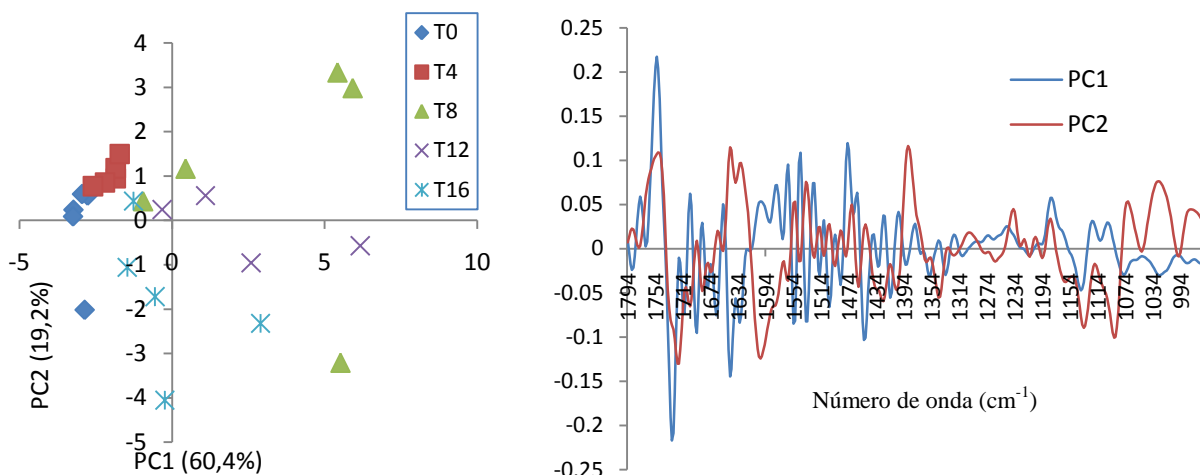


Procedeu-se a uma análise multivariada dos dados para verificar se realmente não existia uma separação das amostras por tempo de análise, como era sugerido apenas pela análise dos espectros. Utilizou-se a zona do espectro de 1800 a 950  $\text{cm}^{-1}$ , pois foi aquela que, pela observação dos espectros, mostrou ser mais variável de caso para caso. Além disso, esta zona é considerada por vários autores como sendo uma zona de “fingerprint” para a diferenciação de microrganismos (Maquelin *et al.*, 2002; Yu e Irudayaraj, J., 2004; Oliveira, 2006 e Pereira, 2006). As figuras 4, 5, 6 e 7 correspondem aos diagramas das coordenadas factoriais (esquerda) e mapas das contribuições factoriais (direita) relativos ao local 1 e marca A, local 1 e marca B, local 2 e marca A e local 2 e marca B, respectivamente, para os tempos 0, 4, 8, 12 e 16 após a preparação das amostras.

Observa-se que para ambas as marcas adquiridas no local 1 (figuras 4 e 5) não existe separação das amostras por tempo de análise, como seria de esperar, dada a grande heterogeneidade dos espectros. O mapa das contribuições factoriais é bastante ruidoso para ambos os casos.

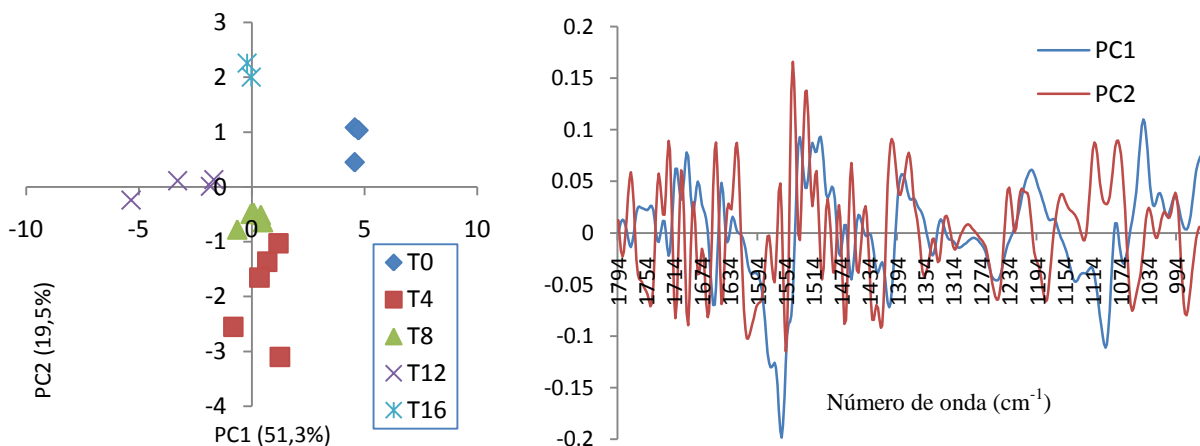


**Figura 4:** Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) para o fiambre medido directamente (fatias de 0,5 cm de espessura) correspondente à marca A e local 1, analisado aos dias 0, 4, 8, 12 e 16.

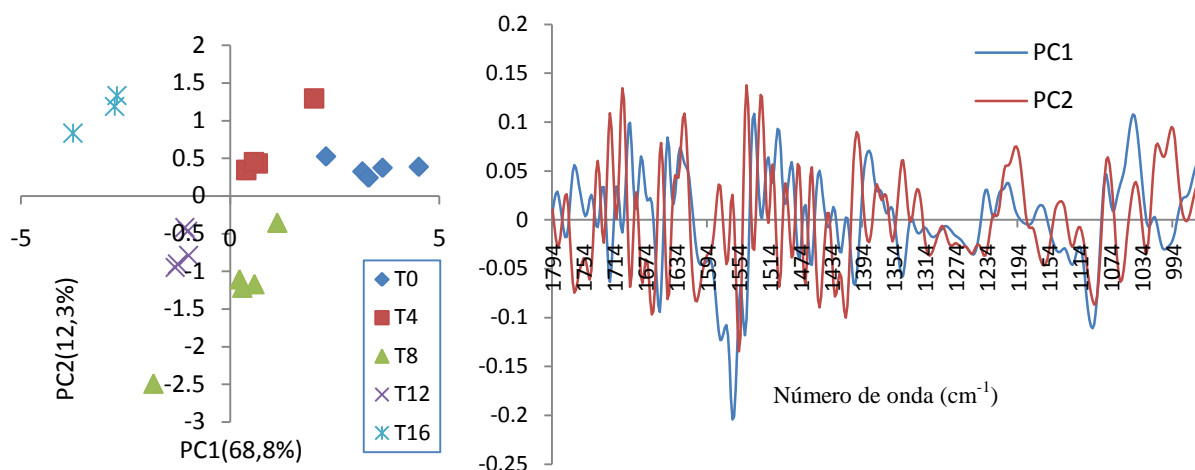


**Figura 5:** Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) para o fiambre medido directamente (fatias de 0,5 cm de espessura) correspondente à marca B e local 1, analisado aos dias 0, 4, 8, 12 e 16.

As figuras relativas às amostras adquiridas no local 2 (figuras 6 e 7), por outro lado, mostram que existe um agrupamento das amostras por tempos de análise. Analisando ambos os mapas das contribuições factoriais verifica-se que existe demasiado ruído em ambos os PC utilizados, pelo que não se pode concluir quais os grupos funcionais que permitem a separação das amostras por tempo de análise.

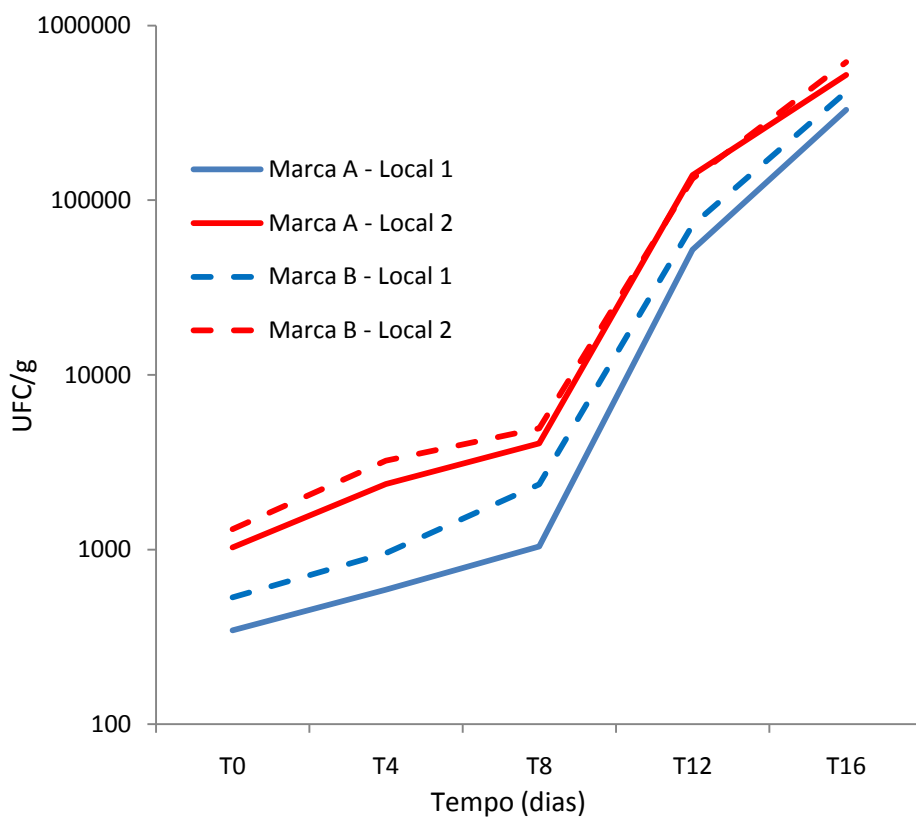


**Figura 6:** Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) para o fiambre medido directamente (fatias de 0,5 cm de espessura) correspondente à marca A e local 2, analisado aos dias 0, 4, 8, 12 e 16.



**Figura 7:** Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) para o fiambre medido directamente (fatias de 0,5 cm de espessura) correspondente à marca B e local 2, analisado aos dias 0, 4, 8, 12 e 16.

Para estas amostras foram determinadas as unidades formadoras de colónias por grama de fiambre homogeneizado em soluto de Ringer (razão de 1:10), cujo resultado é apresentado na figura 8.

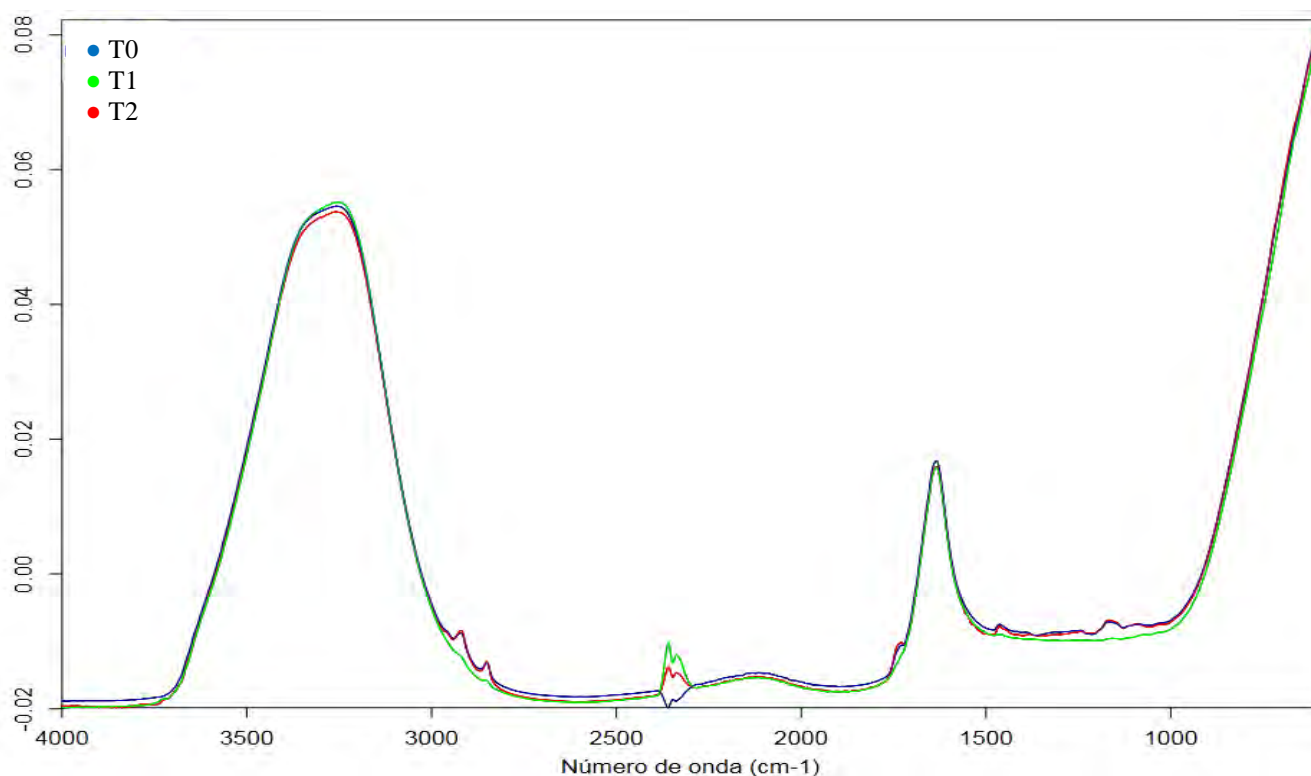


**Figura 8:** Variação do número de unidades formadoras de colónias por grama de fiambre ao longo do tempo, para cada um dos locais e cada uma das marcas analisadas.

Observa-se um aumento da carga microbiana ao longo do tempo, como seria de esperar, sendo o aumento mais acentuado verificado entre o tempo 8 e o tempo 12. Verificou-se que as colónias começaram a tornar-se visíveis na superfície do fiambre entre o tempo 9 e o tempo 10, o que coincide com o aumento acentuado do número de unidades formadoras de colónias. O local 2 apresenta mais unidades formadoras de colónias do que o local 1, provavelmente devido a falta de higiene no armazenamento ou corte do fiambre. Verifica-se ainda que a marca B apresenta também níveis ligeiramente mais elevados de microrganismos totais, também talvez por existir falta de higiene no processo de fabrico do próprio fiambre. Estas diferenças não foram detectadas no FT-IR, uma vez que o método de amostragem utilizado neste ensaio não permitiu obter bons resultados.

#### Medição do fiambre homogeneizado:

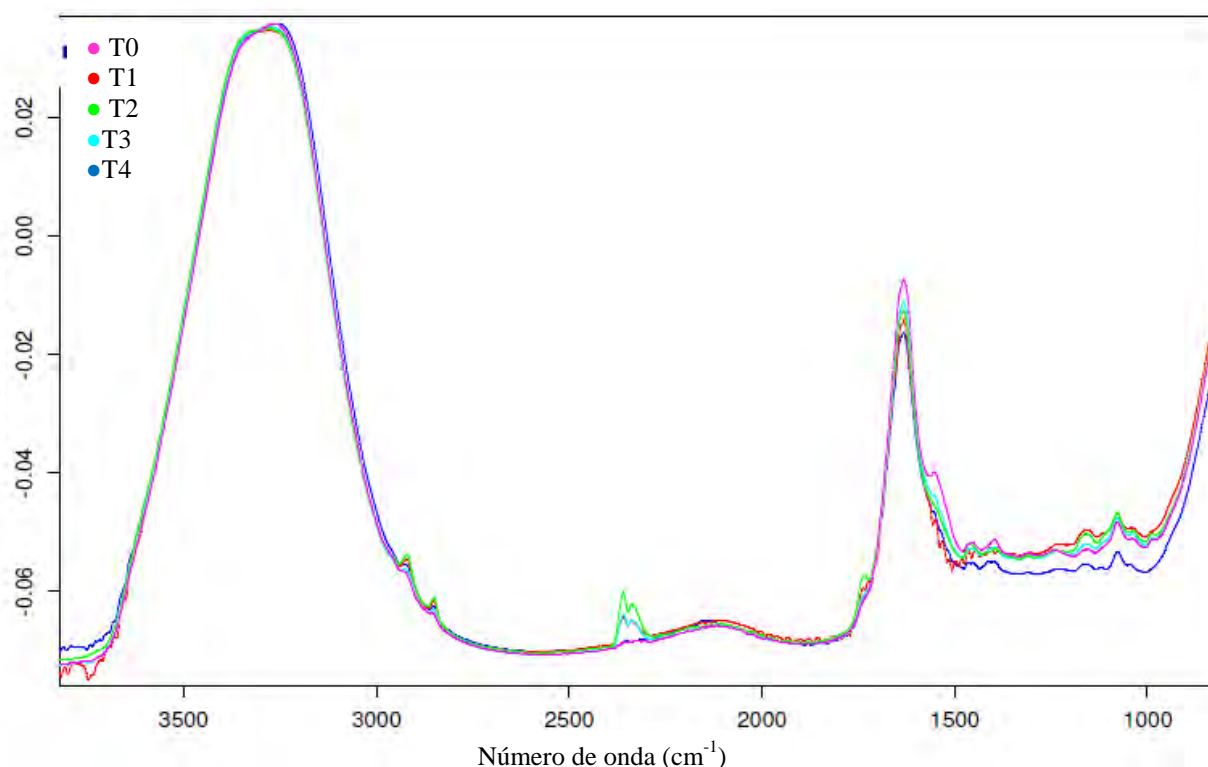
A figura 9 representa as médias dos espectros de fiambre cuja análise foi realizada colocando uma gota de fiambre homogeneizado em soluto de Ringer (1:10) no acessório de amostragem. Não se observa qualquer padrão nos espectros conforme o aumento do tempo de envelhecimento do fiambre e os espectros são muito semelhantes entre si, pois o fiambre encontra-se diluído e o sinal é pouco intenso devido a uma grande predominância do espectro da água, revelando que este método de análise do fiambre não permite obter resultados satisfatórios.



**Figura 9:** Conjunto das médias dos espectros de fiambre homogeneizado em soluto de Ringer (1:10), para cada um dos tempos analisados.

#### Medição directa do fiambre (fatias de 0,1 cm):

Procedeu-se à medição directa de fatias finas de fiambre pressionadas contra o acessório de amostragem com uma força constante, de forma a garantir que a amostra estivesse em contacto com o acessório de amostragem, preenchendo toda a superfície do cristal, o que não acontecia utilizando fatias mais espessas, pois a “flexibilidade” das mesmas era menor devido à sua espessura. Os espectros das réplicas de cada amostra são demasiado diferentes uns dos outros, revelando que este método também não é adequado para analisar o alimento em questão, talvez porque os espectros representem também a matriz do fiambre (que não é totalmente homogéneo) e não só microrganismos. Na figura 10 estão representados os espectros (média de cada um dos tempos de amostragem) correspondentes à medição directa de fatias de fiambre de 0,1 cm de espessura.



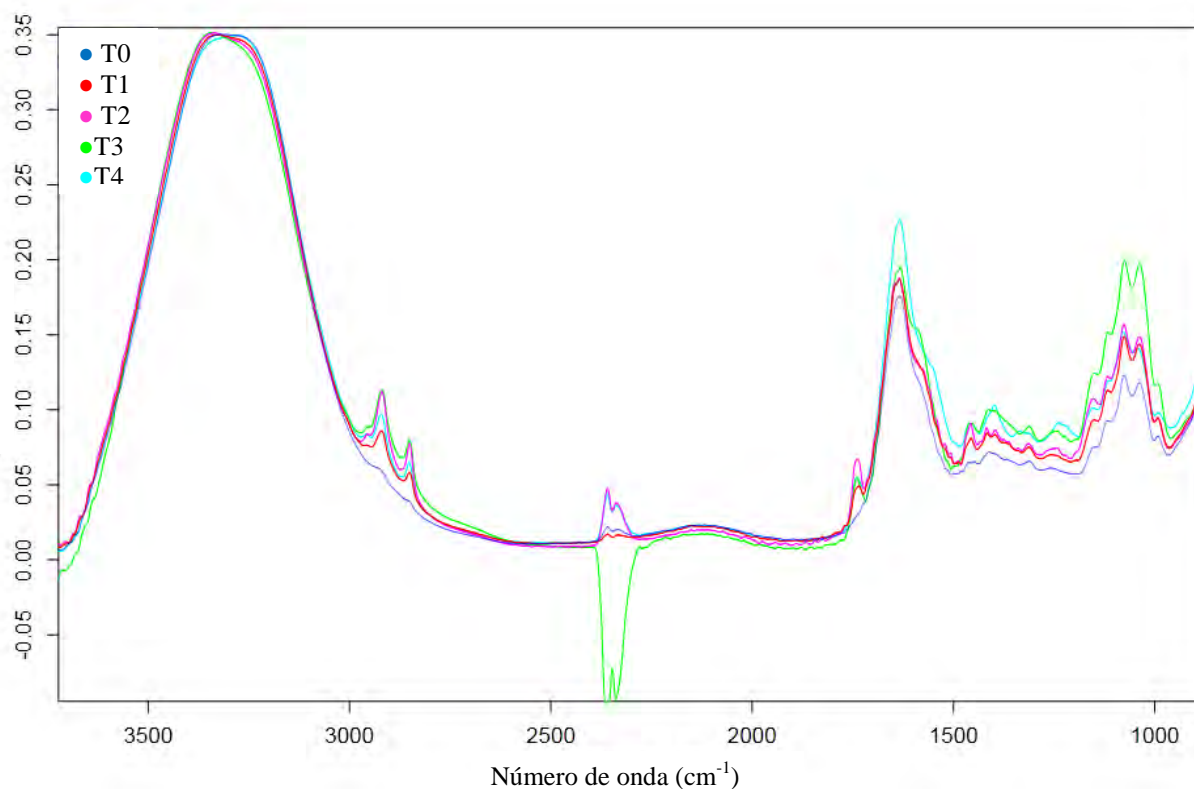
**Figura 10:** Conjunto das médias dos espectros de fiambre fatiado (0,1 cm de espessura), para cada um dos tempos de análise.

Verifica-se que, mesmo tendo em conta a média dos espectros, muitos deles estão ruidosos (problemas relacionados com o funcionamento do próprio espectrómetro), tal como não se nota nenhum padrão de alterações nos espectros ao longo do tempo. Segundo estes resultados, parece que a heterogeneidade do próprio fiambre e a heterogeneidade provocada pelo crescimento localizado de diferentes microrganismos influenciam demasiado os espectros, sendo necessário desenvolver outro método de amostragem que providencie uma melhor homogeneização do produto a analisar.

#### Medição na camada superficial do fiambre (método 1):

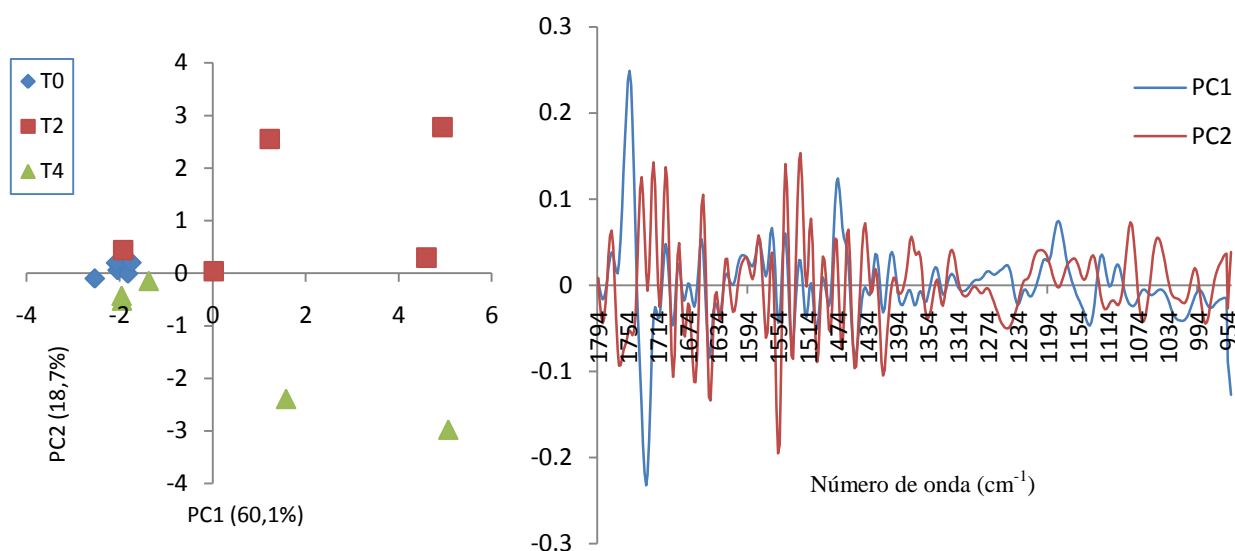
Uma vez que os microrganismos crescem à superfície do fiambre criando uma “película”, testou-se a medição dessa película directamente, após homogeneização da mesma com uma espátula, para tentar evitar que os espectros da mesma amostra fossem demasiado diferentes. A figura 11 representa os espectros da superfície do fiambre, obtidos raspando e misturando bem a superfície do mesmo com uma espátula de alumínio e colocando no acessório de amostragem uma porção suficiente para cobrir o cristal. Verifica-se que os espectros são demasiado heterogéneos e que não há nenhuma alteração visível neles ao longo

do tempo. As várias amostras eram demasiado heterogéneas entre si impossibilitando um agrupamento das mesmas por tempos de análise, o que demonstra que o método de amostragem não é o mais adequado, pois a espátula possivelmente arrastava pequenas partículas de fiambre, alterando o aspecto dos espectros.



**Figura 11:** Conjunto das médias dos espectros de fiambre, para cada um dos tempos, obtidos através da medição da camada superficial do fiambre utilizando o método 1.

A figura 12 diz respeito à análise multivariada dos espectros correspondentes à medição da camada superficial do fiambre através do método 1 (espátula de alumínio). Como se verifica, parece existir uma certa tendência na distribuição das amostras: T0 situa-se bem agrupado no PC1 negativo e PC2 nulo, T2 no PC1 e PC2 positivos e T4 no PC2 negativo. No entanto, estes resultados não são ainda satisfatórios uma vez que se verifica alguma dispersão das amostras e o mapa das contribuições factoriais apresenta bastante ruído.

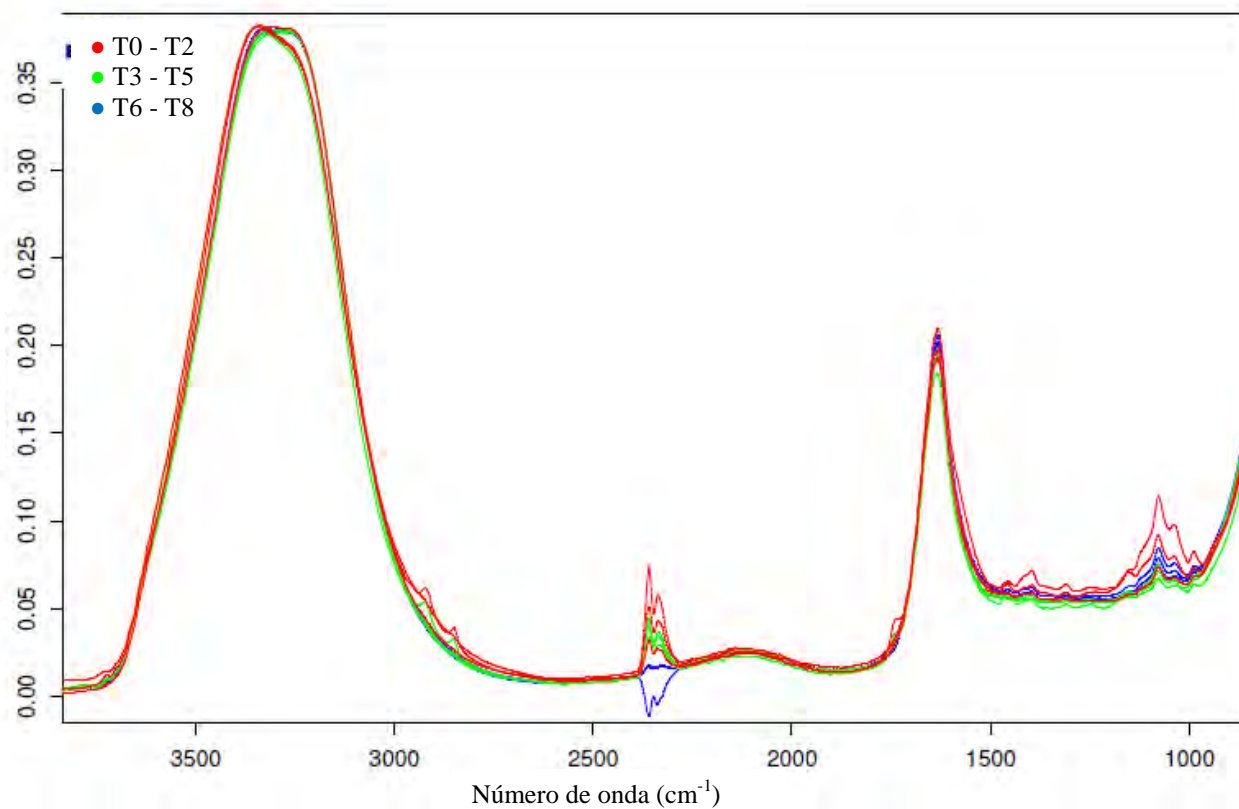


**Figura 12:** Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) para as amostras de fiambre obtidas pela medição da camada superior através do método 1 (Espátula de alumínio), nos tempos de análise T0, T2 e T4.

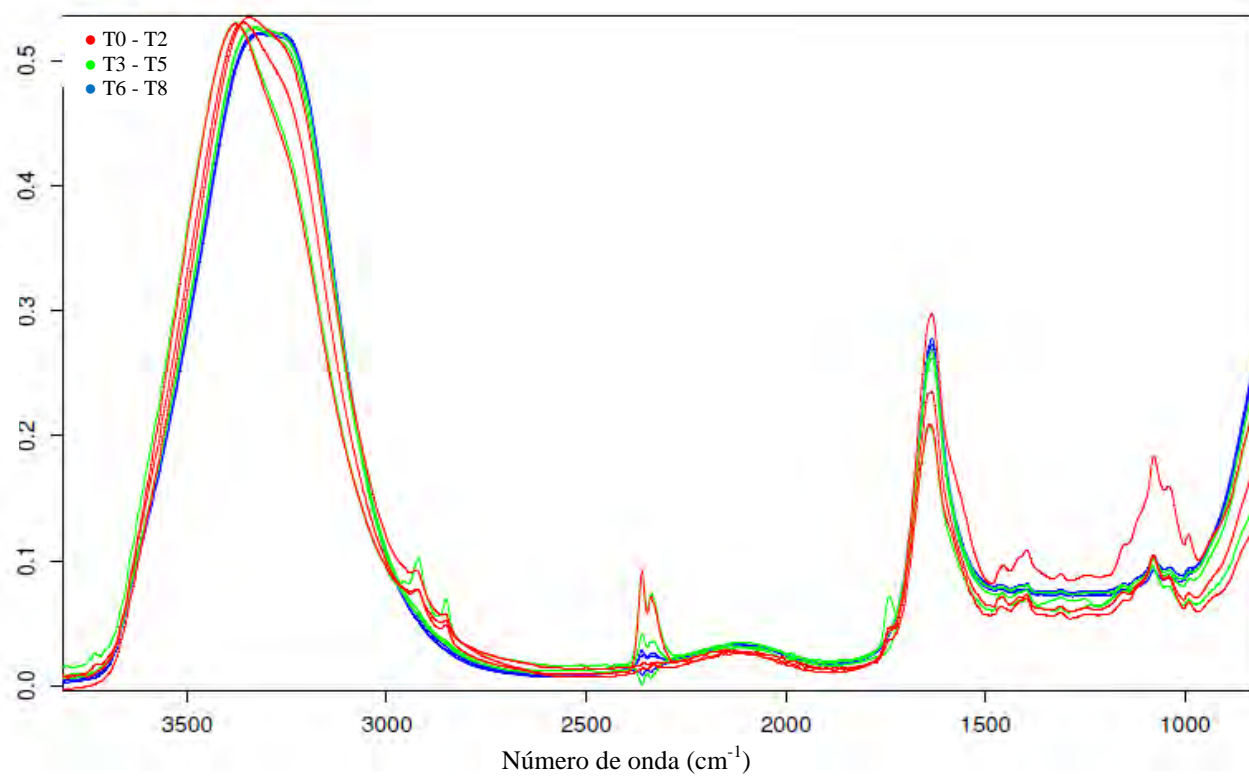
#### Medição na camada superficial do fiambre (método 2):

As figuras 13 e 14 representam a média dos espectros para cada um dos tempos de análise e cada uma das marcas analisadas, A e B, respectivamente, utilizando uma vareta de vidro (ponta arredondada) para a homogeneização e recolha da amostra. Os espectros são um pouco mais homogêneos do que os obtidos pelo método 1, apesar de não se notar nenhum padrão visível na média dos espectros aquando do aumento do tempo de análise. Escolheu-se este método para realizar os ensaios finais por ter sido aquele que, de entre todos os métodos experimentados, permitiu obter melhores espectros.



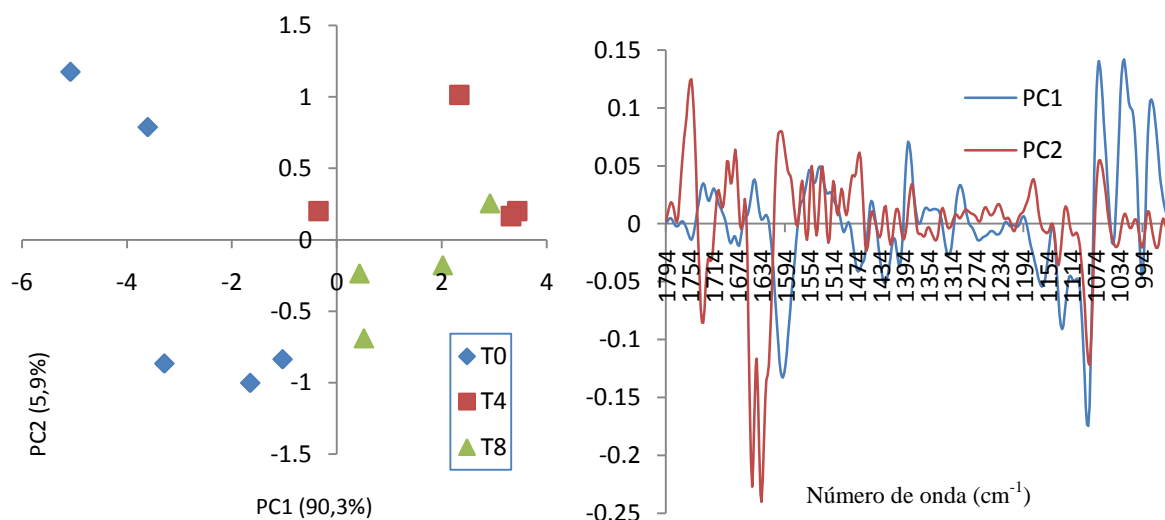


**Figura 13:** Conjunto das médias dos espectros de fiambre, obtidos através da medição da camada superficial do mesmo utilizando o método 2, para cada um dos tempos, relativos à marca A.

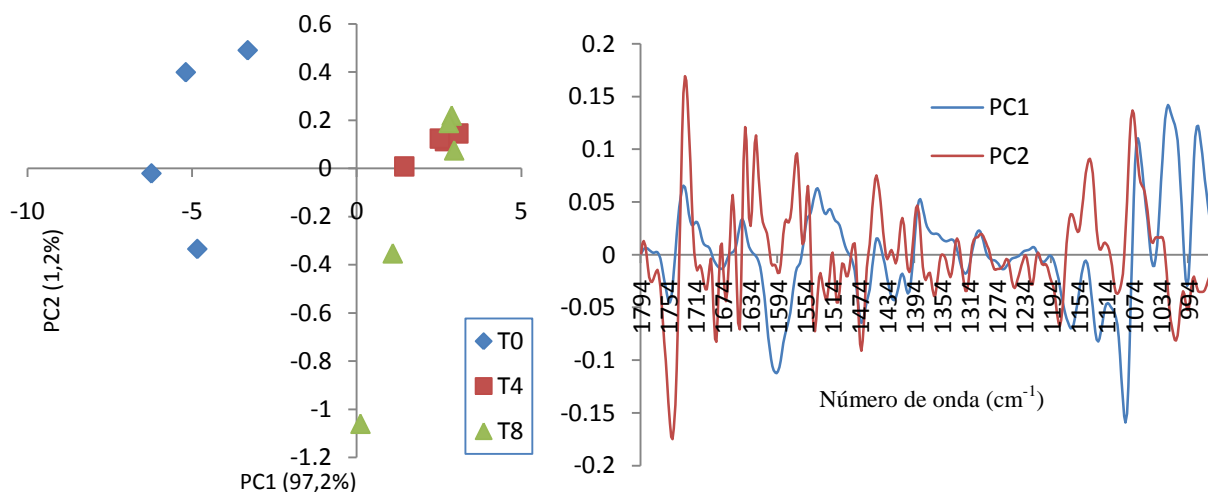


**Figura 14:** Conjunto das médias dos espectros de fiambre, para cada um dos tempos, relativos à marca B.

Nas figuras 15 e 16 estão apresentados o diagrama das coordenadas factoriais e o mapa das contribuições factoriais relativos à medição da superfície do fiambre através do método 2 (T0, T4 e T8), marca A e B, respectivamente. A separação das amostras relativas aos vários tempos não é perfeita, no entanto, existe uma tendência para o agrupamento das amostras por tempo de análise e os mapas das contribuições factoriais são menos ruidosos do que nos casos anteriores.



**Figura 15:** Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais relativo à medição da camada superficial pelo método 2, marca A, analisado nos dias 0, 4 e 8.



**Figura 16:** Diagrama das coordenadas factoriais e mapa das contribuições factoriais relativo à medição da camada superficial pelo método 2, marca B, analisado no dia 0, 4 e 8.

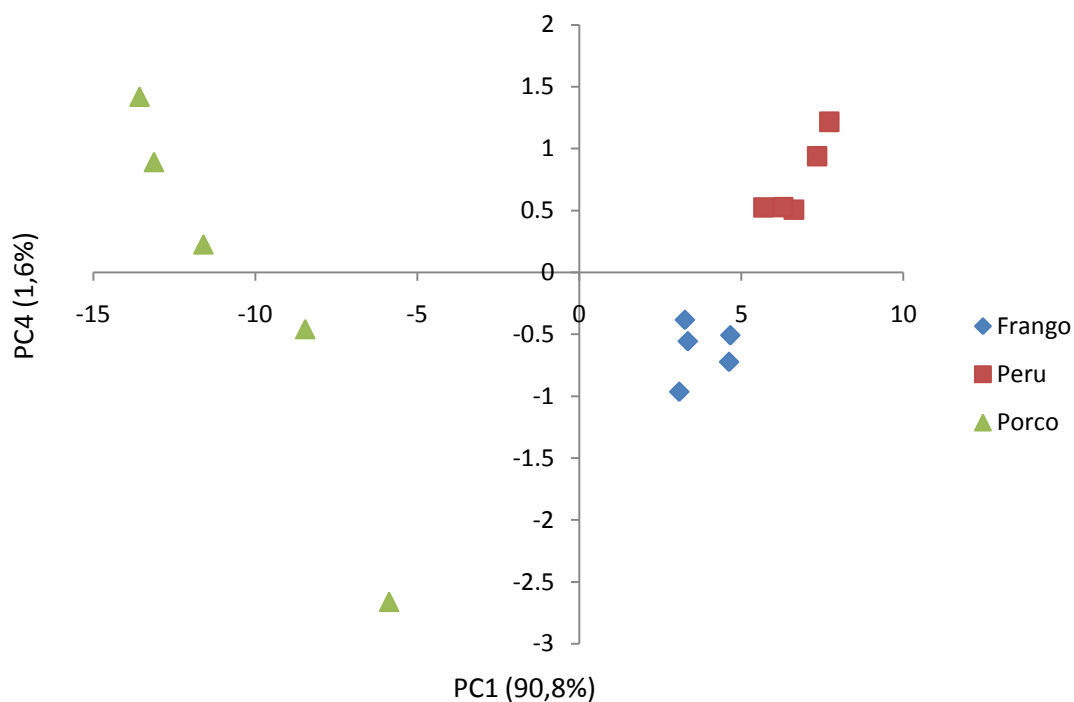
### 3.2. Ensaios com amostras de fiambre embalado e fresco

Após realização e análise dos ensaios prévios verificou-se que o método de amostragem que permitiu obter melhores resultados foi a homogeneização da película superficial do fiambre com uma vareta de vidro, pois a ponta arredondada permitiu recolher o líquido existente na superfície do fiambre sem arrastar partículas do mesmo. Assim sendo efectuaram-se 2 ensaios gerais, utilizando este método de amostragem para analisar fiambre pré-embalado e fiambre fresco.

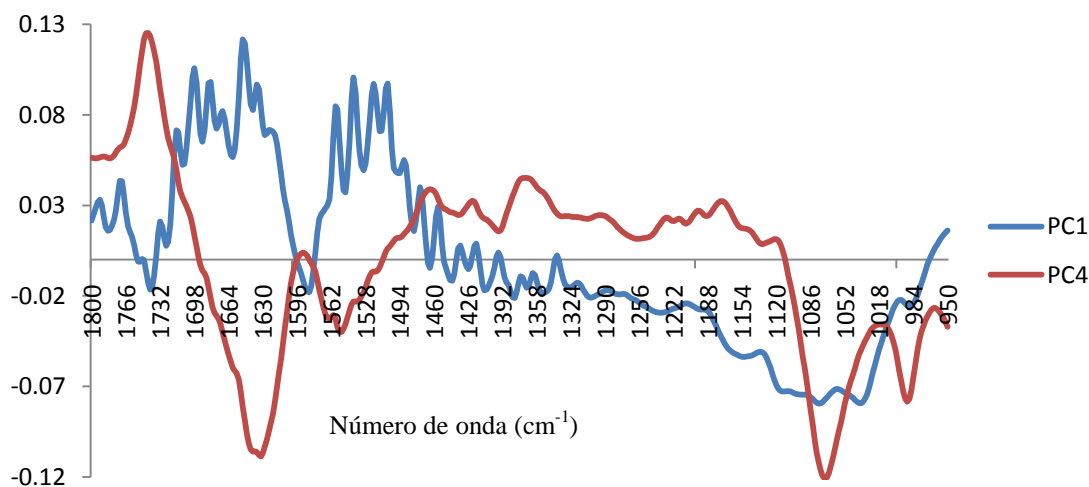
#### Fiambre embalado:

Efectuou-se uma análise de fiambre pré-embalado de duas marcas diferentes (A e B), tendo em conta a medição da camada superficial do alimento recolhida com uma vareta de vidro de ponta convexa.

De forma a tentar obter uma diferenciação de marcas, tipos e alguns dos tempos de análise dos vários tipos de fiambre, foi realizada uma análise PCA. A figura 17 mostra uma boa separação dos vários tipos de fiambre da marca A. Pode ainda verificar-se que o fiambre de porco é o mais heterogéneo de todos, encontrando-se no PC1 negativo, enquanto o fiambre de peru e de frango ficam situados no PC1 positivo. A figura 18 corresponde ao mapa das contribuições factoriais. O fiambre de peru e de frango estão caracterizadas pelo PC1 positivo na zona das amidas I e II das proteínas ( $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente). O PC4 mostra uma alteração na zona dos açúcares e outros tipos variados de ligações ( $1300\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ ) e também na zona de cerca de  $1750\text{ cm}^{-1}$ , característica dos ésteres (lípidos). Estes resultados sugerem que os vários tipos de fiambre diferem na sua constituição em proteína, gordura e açúcares, bem como outros compostos aos quais não se pode fazer uma atribuição, uma vez que existe absorção numa zona de variados tipos de ligações em que não se podem especificar os grupos funcionais presentes.



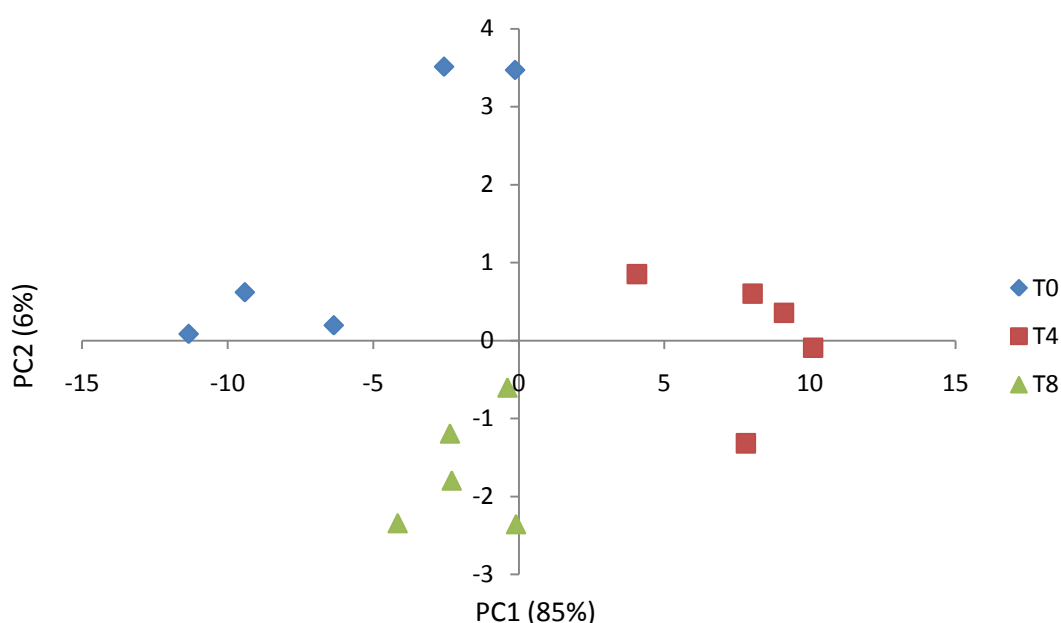
**Figura 17:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC4) relativo aos vários tipos de fiambre analisados (porco, peru e frango), da marca A.



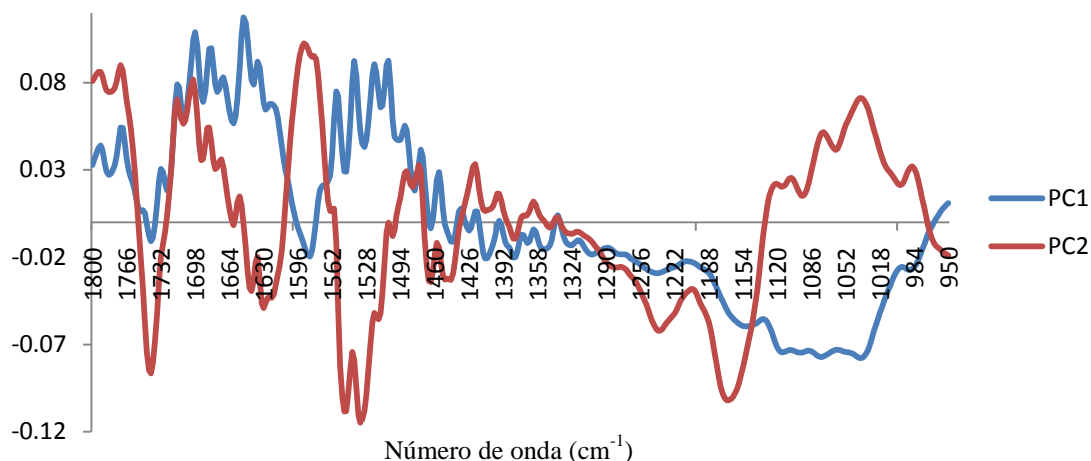
**Figura 18:** Mapa das contribuições factoriais (PC1 vs PC4) relativo aos vários tipos de fiambre analisados, marca A.

A figura 19 é relativa a fiambre embalado de porco da marca A. Verifica-se uma separação entre os 3 tempos estudados. Nota-se ainda uma maior heterogeneidade entre as várias amostras do tempo 0 do que nas restantes, possivelmente porque o crescimento microbiano ainda é baixo e existe a hipótese dos espectros representarem mais os líquidos libertados pela carne do que os microrganismos. O diagrama das contribuições factoriais (figura 20) dá a informação de que o T4 se encontra caracterizado pela zona das proteínas

(amida I e amida II – aproximadamente 1650 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ ), embora esta zona seja bastante ruidosa, o que é normal, uma vez que a amida I absorve no mesmo local que a água, aumentando a humidade nesta zona do espectro e tornando-o mais irregular. O T0 e o T8 também se encontram caracterizados pela zona das amidas e pela zona da gordura (1740  $\text{cm}^{-1}$ ). É também de notar que todas as amostras são influenciadas pelo conteúdo em polissacarídeos (açúcares) e outros tipos de ligações (1300-950  $\text{cm}^{-1}$ ). Sabe-se que durante a fase de crescimento das bactérias existe variação nos ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e polissacarídeos, pelo que é normal que haja uma distinção das amostras por tempos de análise baseada na estrutura celular das bactérias, que se vai alterando com o tempo.

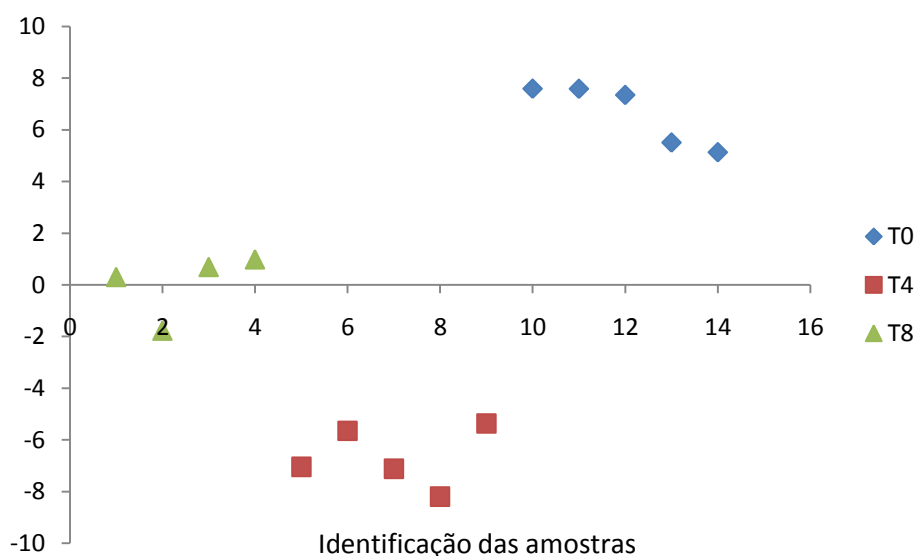


**Figura 19:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC2) aos dias 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de porco, marca A.

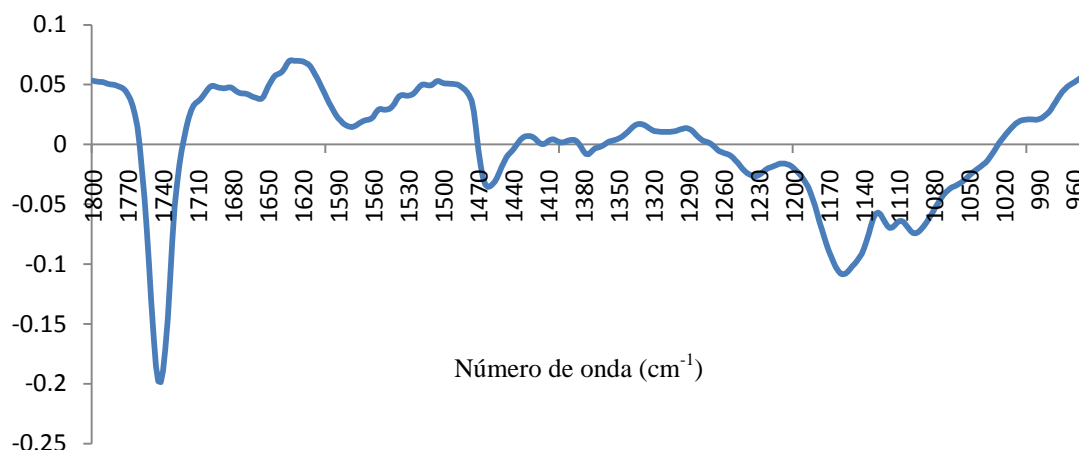


**Figura 20:** Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) relativo a fiambre embalado de porco, marca A.

A figura 21 é relativa ao fiambre de frango, marca A, e a figura 22 corresponde o respectivo mapa de contribuições factoriais. Nota-se uma excelente separação entre os 3 tempos analisados, bem como uma boa homogeneidade entre as amostras, com base no PC1, que tem uma contribuição de 88% para a separação das amostras. Estas são caracterizadas principalmente pela zona dos ésteres ( $1750\text{ cm}^{-1}$ ), amidas ( $1650$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$ ) e variados tipos de ligações onde constam açúcares ( $1300\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ ).

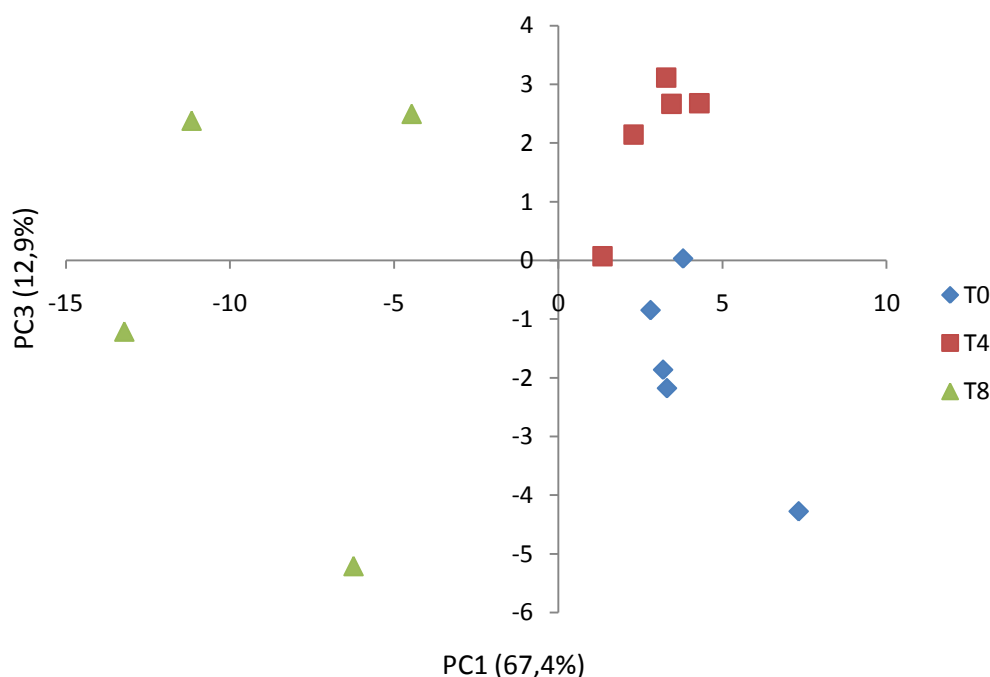


**Figura 21:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1) aos dias 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de frango, marca A.

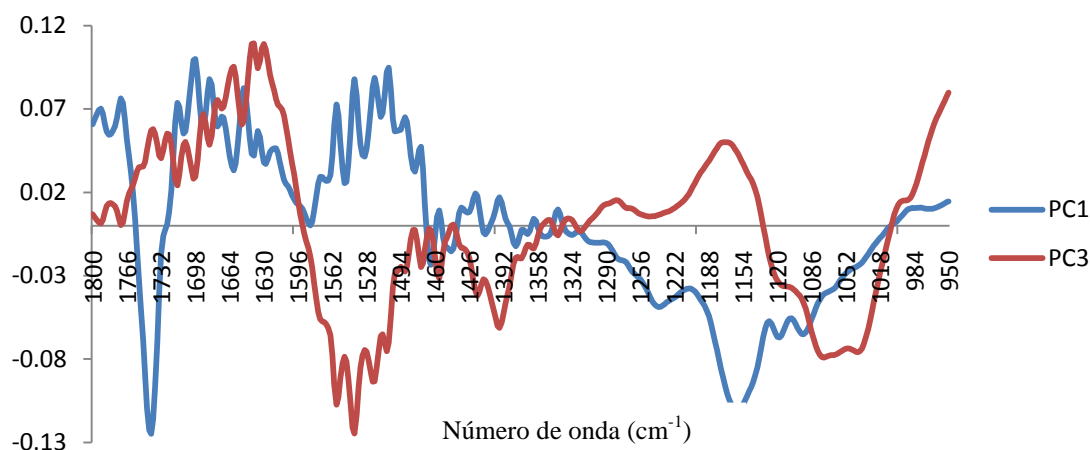


**Figura 22:** Mapa das contribuições factoriais (PC1) relativo a fiambre embalado de frango, marca A.

Na figura 23 são apresentados os resultados da análise de fiambre embalado de peru, da marca A. Existe separação entre os tempos analisados, especialmente entre o T8 e os restantes dois tempos analisados (T0 e T4). O diagrama das contribuições factoriais mostra uma contribuição de amidas ( $1650$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$ ) de proteínas, o T8 é principalmente caracterizado pela zona dos lípidos ( $1740\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ ), o que faz sentido, uma vez que após 8 dias o fiambre já tem um crescimento microbiano elevado e os microrganismos contêm lípidos (fosfolípidos) na sua constituição. Todas as amostras contam ainda com uma contribuição de açúcares e outros compostos impossíveis de distinguir pois há absorção na zona onde se encontram diversos tipos de ligações ( $1300\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ ).

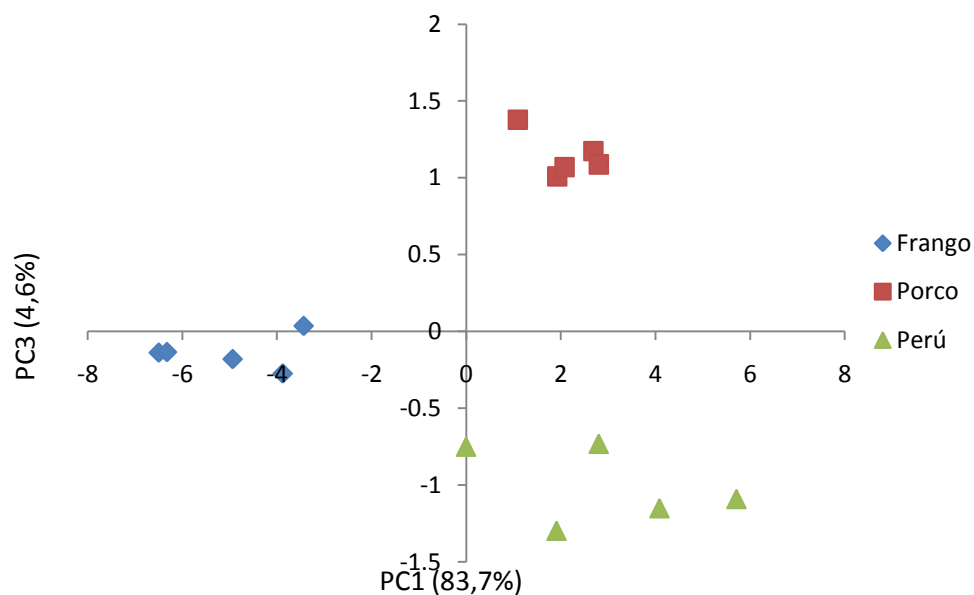


**Figura 23:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) aos dias 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de peru, marca A.



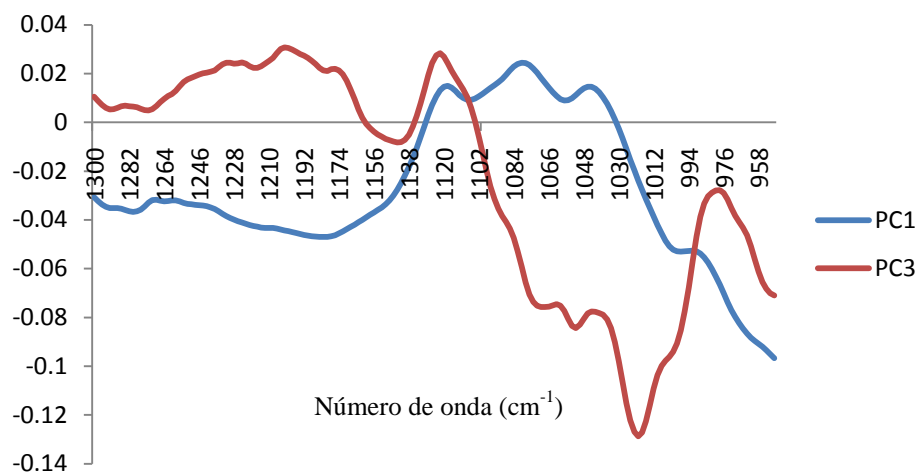
**Figura 24:** Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC3) relativo a fiambre embalado de peru, marca A.

Na figura 25 encontram-se os resultados de PCA dos vários tipos de fiambre embalado analisados da marca B, sendo óbvia a separação entre eles. Foi escolhida apenas a zona espectral entre 1300 e 950  $\text{cm}^{-1}$ , onde se nota que é a contribuição de açúcares e outros tipos de ligações que permite o agrupamento das amostras por tempos de análise.



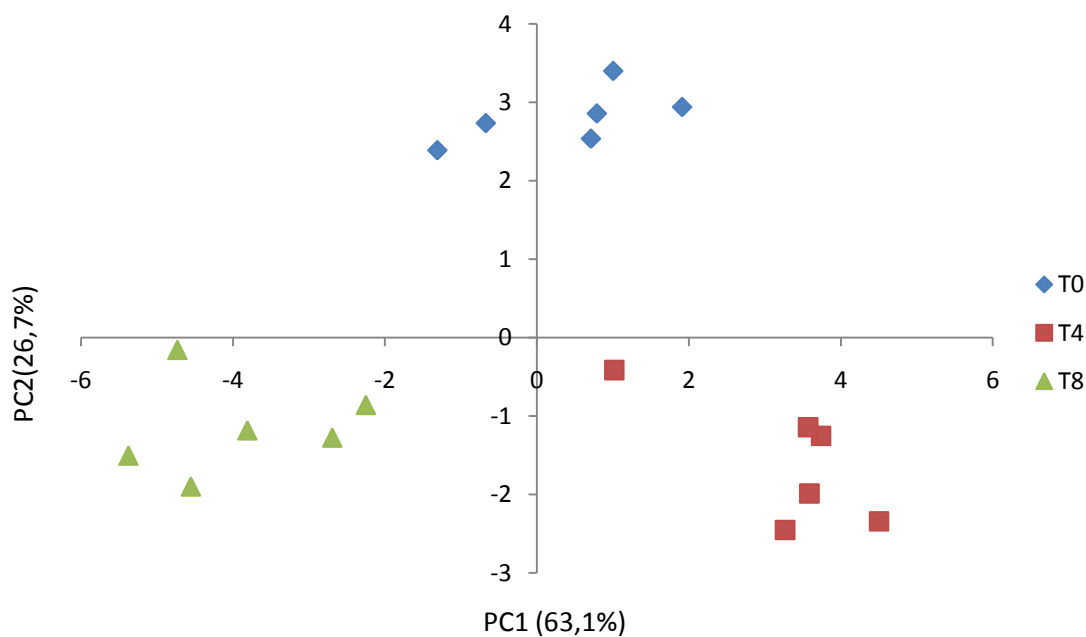
**Figura 25:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) relativo aos vários tipos de fiambre, marca B.



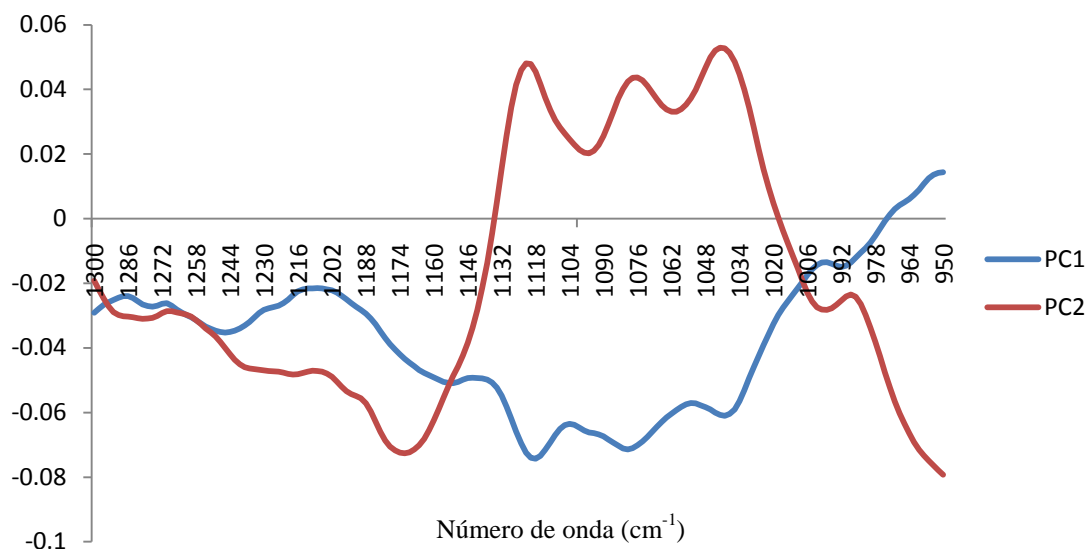


**Figura 26:** Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC3) relativo aos vários tipos de fiambre embalado, marca B.

Na figura 27 verifica-se uma separação entre os 3 tempos analisados, para o fiambre de porco da marca B. Na figura 28 está o mapa das contribuições factoriais. Mais uma vez foi utilizada apenas a zona entre 1300 e 950  $\text{cm}^{-1}$  por ser aquela que permitiu uma melhor separação entre tempos de análise, mostrando uma contribuição da zona dos açúcares para a separação das amostras, corroborando o que já se tinha verificado nos ensaios anteriores.

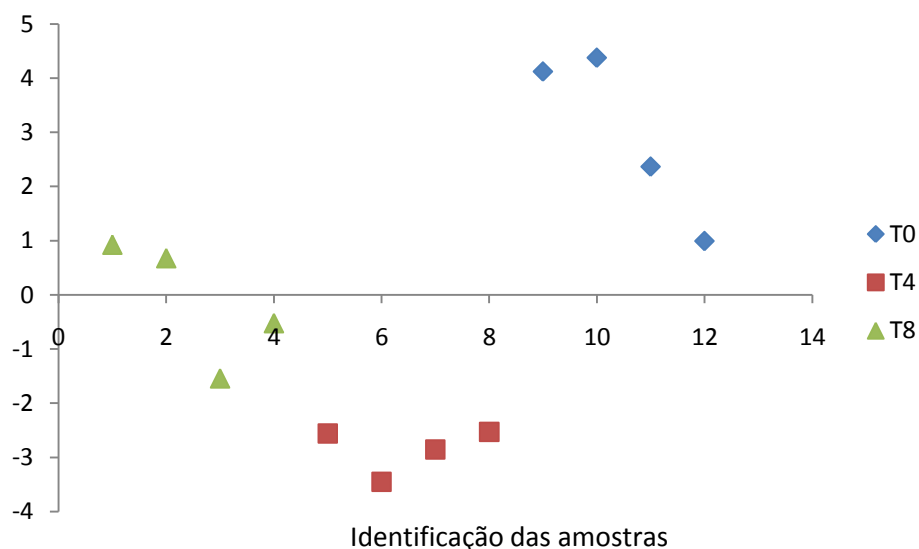


**Figura 27:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC2) aos dias 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de porco, marca B.

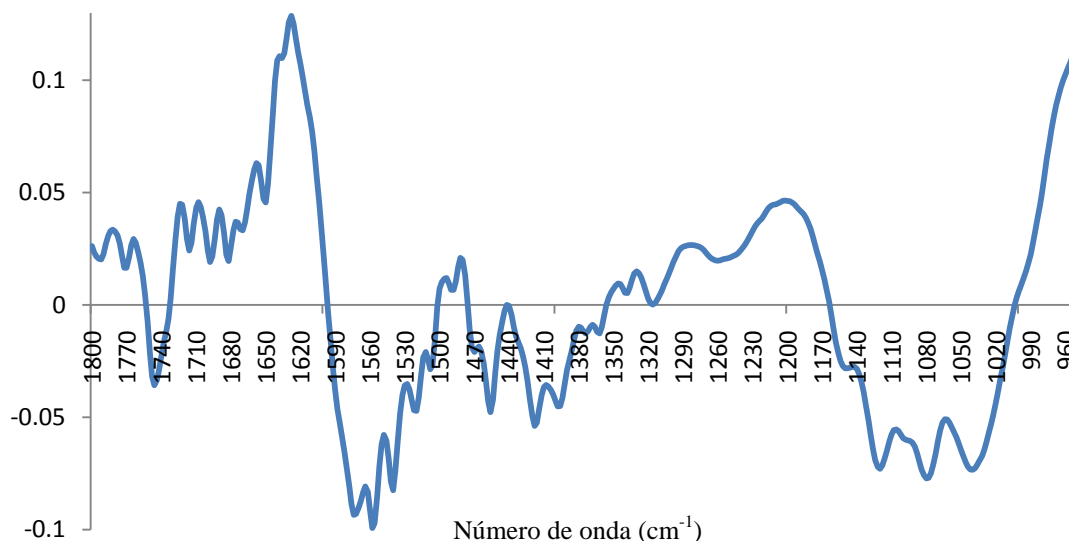


**Figura 28:** Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC2) relativo a fiambre embalado de porco, marca B.

Na figura 29 estão os resultados relativos à separação de 3 tempos de fiambre de frango embalado da marca B, tendo em conta o PC1 (51,3%). Segundo o mapa das contribuições factoriais (figura 30) o T4 tem uma grande contribuição de amida II de proteína para a sua separação ( $1550\text{ cm}^{-1}$ ), bem como de lípidos ( $1740\text{ cm}^{-1}$ ), enquanto que o T0 e o T8 contam com a contribuição da amida I ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ). Todos os tempos de análise têm ainda a contribuição da zona de variados tipos de vibrações e dos açúcares ( $1300\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ ).

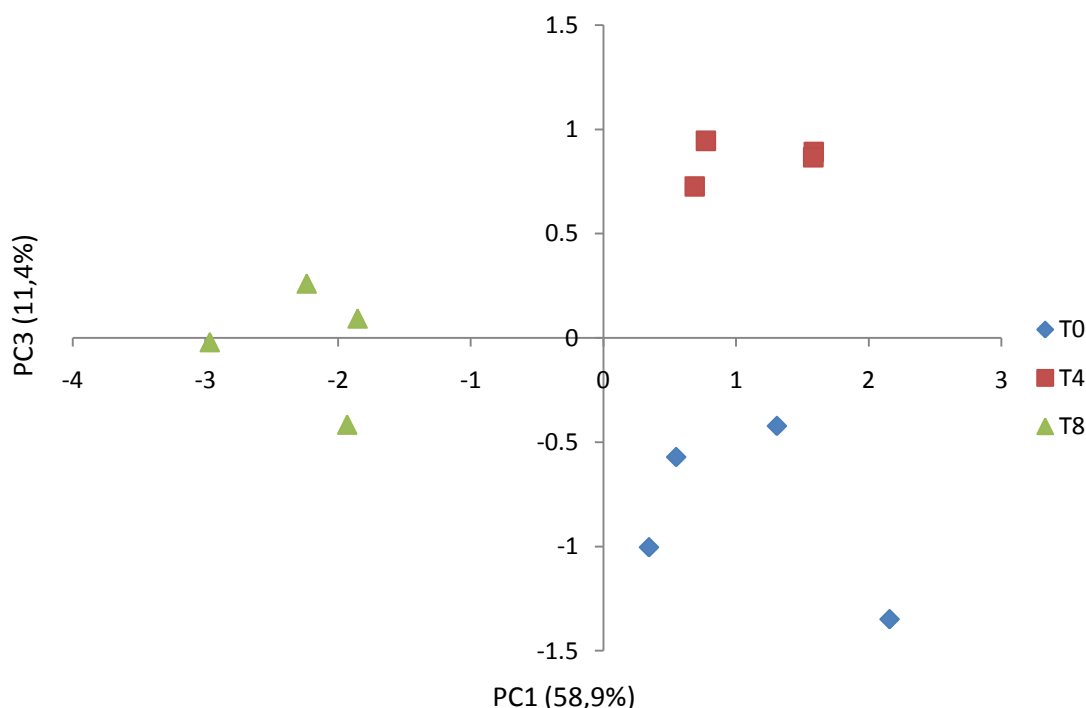


**Figura 29:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1) ao tempo 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de frango, marca B.

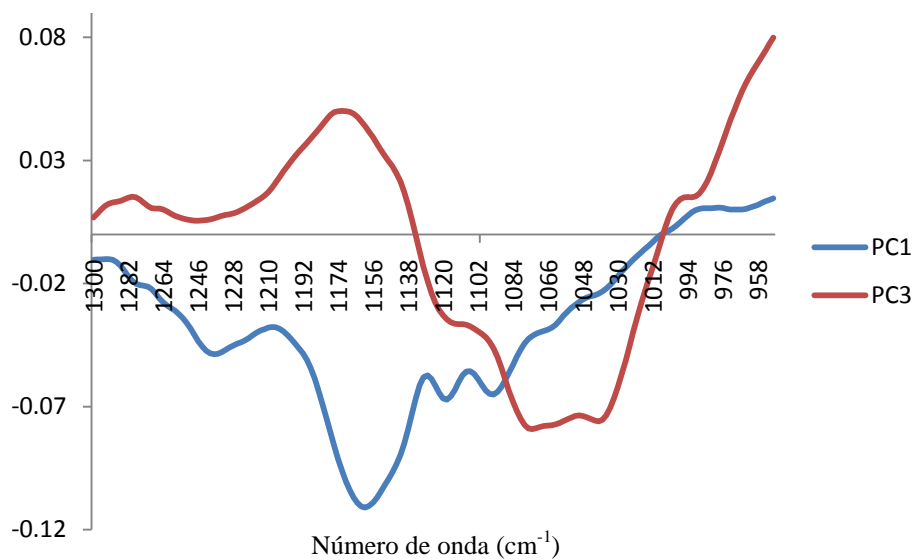


**Figura 30:** Mapa das contribuições factoriais (PC1) relativo a fiambre embalado de frango, marca B.

Na figura 31 e 32 estão representados o diagrama das coordenadas factoriais e o mapa das contribuições factoriais, respectivamente, para 3 tempos de análise de fiambre de peru embalado. Foi utilizada apenas a zona entre 1300 e 950  $\text{cm}^{-1}$  por ser aquela que permitiu uma melhor separação por tempos de análise. O tempo 8 encontra-se separado dos restantes dois no PC1 negativo, enquanto os outros estão no PC1 positivo. As amostras encontram-se separadas tendo em conta os açúcares e diversos tipos de ligações.

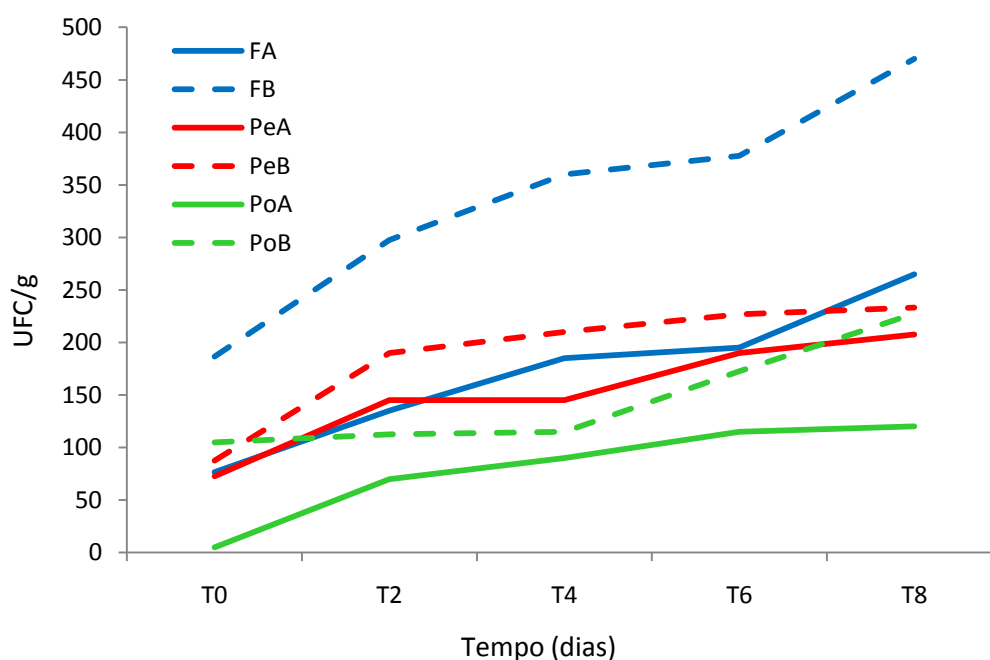


**Figura 31:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) aos dias 0, 4 e 8, relativo a fiambre embalado de peru, marca B.



**Figura 32:** Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC3) relativo a fiambre embalado de peru, marca B.

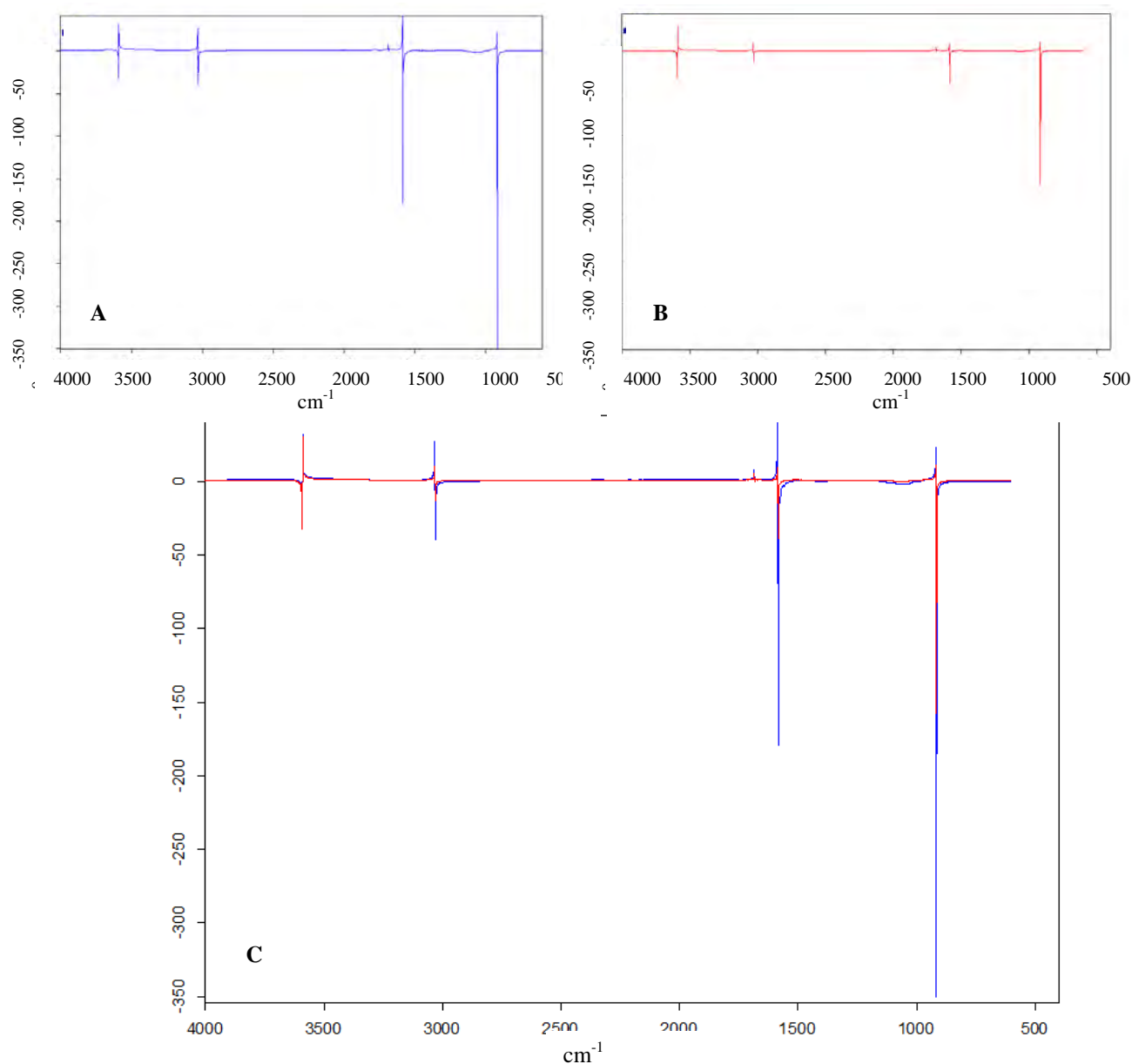
Na figura 33 verifica-se um aumento das unidades formadoras de colónias por grama de fiambre ao longo do tempo, para os três tipos de fiambre e para as duas marcas testadas. Existe um aumento consistente de UFC ao longo do tempo, verificando-se uma maior densidade destas na marca B, em todos os tipos de fiambre. O fiambre embalado foi o que apresentou o menor número de colónias em todo o estudo, no entanto, apesar da baixa densidade de microrganismos presentes no fiambre embalado, foi possível distinguir os tempos de análise 0, 4 e 8 dias no FT-IR. Embora a zona do espectro utilizada seja uma zona onde é possível detectar a presença/quantidade de microrganismos, é provável que a distinção tenha sido feita com base nas características do próprio fiambre e não na densidade microbiana, pois em casos anteriores foi verificado que só foi possível distinguir tempos de análise em que os teores microbianos diferiam muito mais do que neste caso (ensaio prévio 1, fatias de 0,5 cm).



**Figura 33:** Unidades formadoras de colónias por grama de fiambre, para cada um dos tempos de análise, para cada marca e tipo de fiambre. FA – fiambre de frango da marca A; FB – fiambre de frango da marca B; PeA – fiambre de peru da marca A; PeB – fiambre de peru da marca B; PoA – fiambre de porco da marca A; PoB – fiambre de porco da marca B.

Para tentar perceber o motivo pelo qual a carga microbiana do fiambre embalado é tão diferente da do fiambre fresco, foram normalizados e depois sobrepostos espectros da superfície de fiambre embalado e fiambre fresco da mesma marca, obtidos logo após aquisição do fiambre, tendo sido ainda ambos os espectros divididos pelo espectro da água para eliminar a contribuição desta, pois a presença de água pode mascarar a presença de

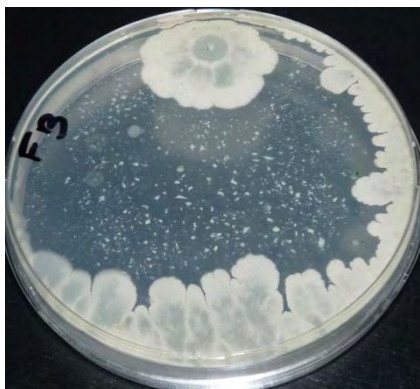
outros compostos. A figura 34 corresponde aos espectros de fiambre embalado dividido pelo espectro da água (A), fiambre fresco dividido pelo espectro da água (B) e uma sobreposição de ambos (C).



**Figura 34:** Espectro de fiambre fresco da marca A dividido por um espectro de água (A); espectro de fiambre embalado da marca A dividido por um espectro de água (B) e uma sobreposição dos dois espectros (C).

A maior diferença a assinalar entre os dois tipos de fiambre é a existência de 2 picos muito maiores no fiambre embalado do que no fiambre fresco, situados a aproximadamente  $918 \text{ cm}^{-1}$  e  $1585 \text{ cm}^{-1}$ . O pico em  $918 \text{ cm}^{-1}$  pode corresponder a diversos compostos sendo impossível especificar o que poderá ser, no entanto, o pico situado a  $1585 \text{ cm}^{-1}$  é provavelmente referente a ácido láctico (Sakhamuri. *et al.*, 2004), pois este composto, apesar

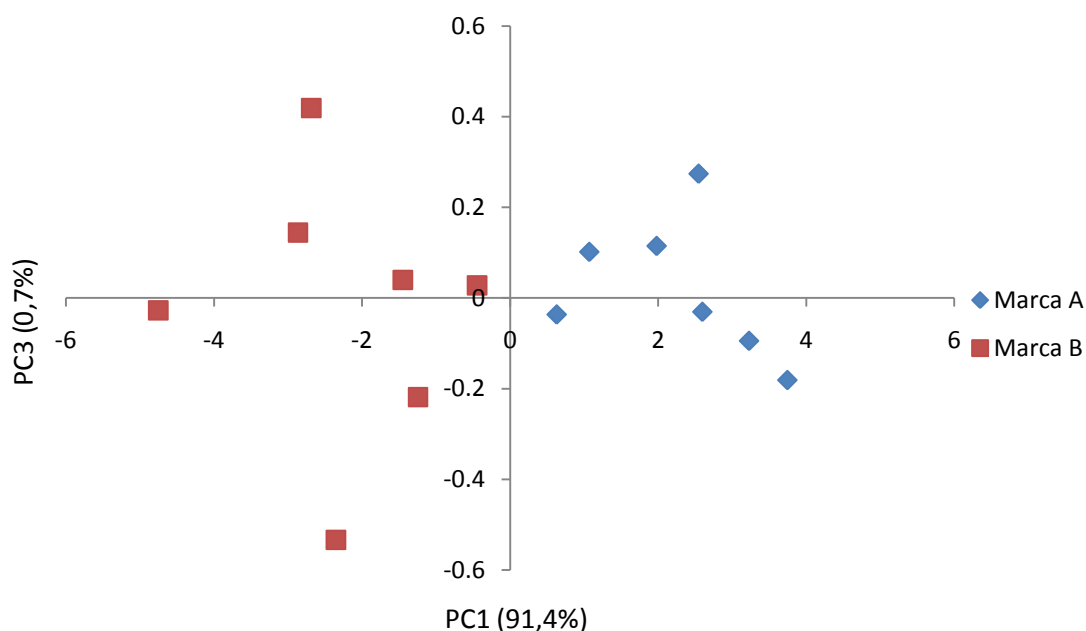
de poder ser produzido por bactérias lácticas como é o caso de espécies de *Lactobacillus*, é muitas vezes adicionado ao fiambre para ajudar à sua conservação (Stekelemburg e Kant-Muermans, 2000), embora este não viesse descrito na secção da composição do fiambre, na embalagem do mesmo. O ácido láctico inibe o crescimento de microrganismos que podem contaminar o fiambre, como é o caso de *Lysteria monocytogenes* (Stekelemburg e Kant-Muermans, 2000; Mellefont. e Ross, 2007). No entanto, há microrganismos capazes de tolerar ou se adaptar a altos níveis de ácido láctico, nomeadamente várias espécies de *Bacillus* (Cotter e Hill, 2003; Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). Verificou-se que as placas de Petri onde se fez a contagem de UFC do fiambre embalado apresentavam todas colónias típicas de bacilos (figura 35) enquanto que as referentes a fiambre fresco apresentavam colónias típicas de bacilos apenas em casos pontuais. Como já foi acima referido esta presença dominante de bacilos pode dever-se à tolerância destas bactérias ao ácido láctico. No entanto, pode também dar-se o caso do ácido láctico supostamente detectado ter sido produzido pelos próprios microrganismos.



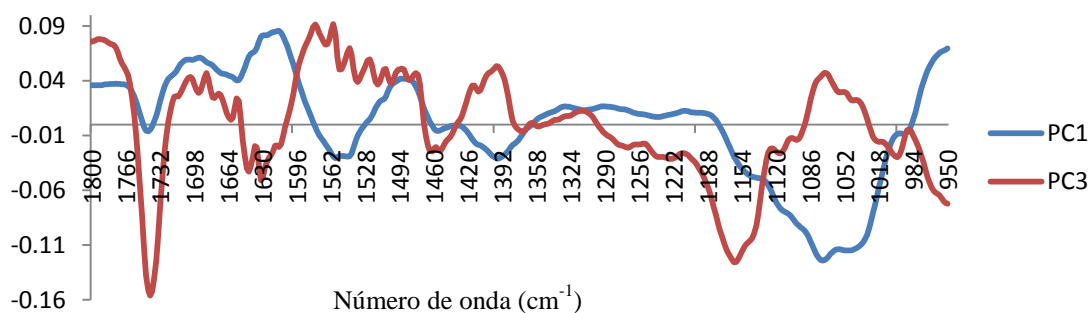
**Figura 35:** Exemplo de uma placa com colónias típicas de bacilos referente a uma amostra de fiambre embalado.

### Fiambre fresco:

A figura 36 corresponde ao diagrama das coordenadas factoriais das 2 marcas de fiambre, A e B, no tempo 0, mostrando uma separação das mesmas, apesar da heterogeneidade das amostras. A figura 37 representa o mapa das contribuições factoriais, onde se verifica que é a zona das amidas I e II de proteínas (aproximadamente 1650 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ ) e a zona dos açúcares e outros compostos (1300-950  $\text{cm}^{-1}$ ) que são responsáveis pela separação das amostras.



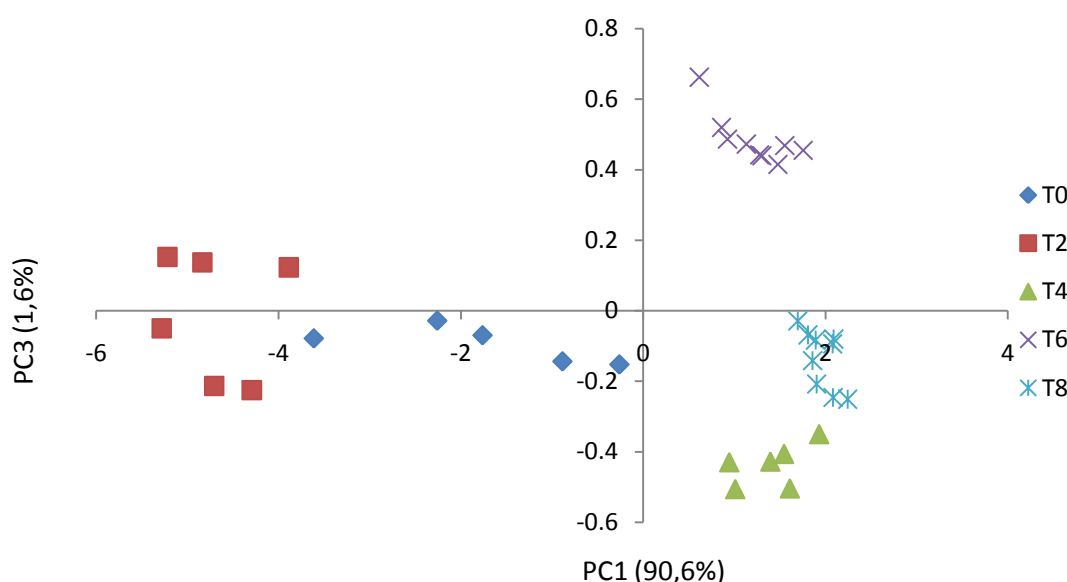
**Figura 36:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) relativos às duas marcas de fiambre analisadas.



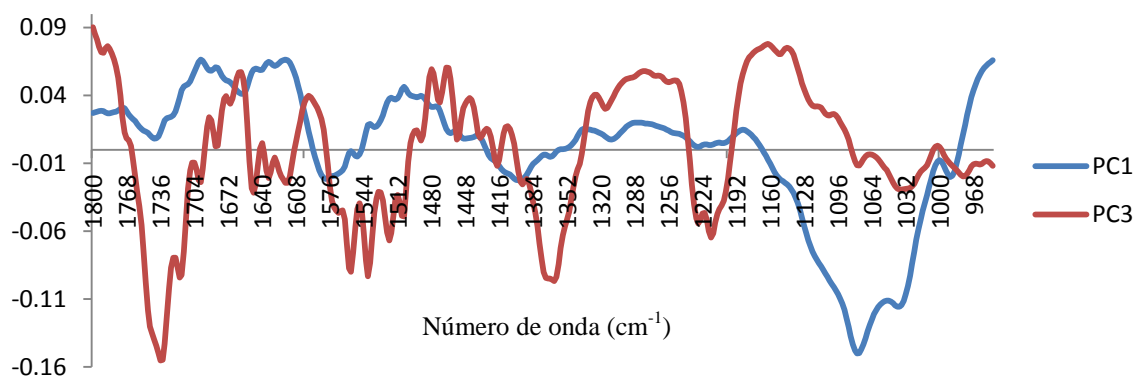
**Figura 37:** Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC3) relativos às duas marcas de fiambre analisadas.



A figura 38 corresponde ao tempo 0, 2, 4, 6 e 8 de análise de fiambre fresco, marca A. O tempo 0 e 2 encontram-se no PC1 negativo e os restantes tempos encontram-se no PC1 positivo. A figura 39 representa o mapa das contribuições factoriais, que mostra que o T0 e T2 diferem das outras amostras principalmente pela sua composição em açúcares e T4, T6 e T8 estão caracterizados pela zona das amidas I e II de proteínas (aproximadamente 1650 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ ). Os últimos dois tempos (T6 e T8) contam ainda com uma caracterização na zona dos lípidos (1750-1740  $\text{cm}^{-1}$ ), possivelmente porque passado 6 dias o fiambre já tem uma carga microbiana bastante elevada, o que aumenta a quantidade de fosfolípidos (existentes na parede celular das bactérias) nas amostras. Todas as amostras contam ainda com uma contribuição na zona dos açúcares e outros tipos de vibrações (1300-950  $\text{cm}^{-1}$ ).

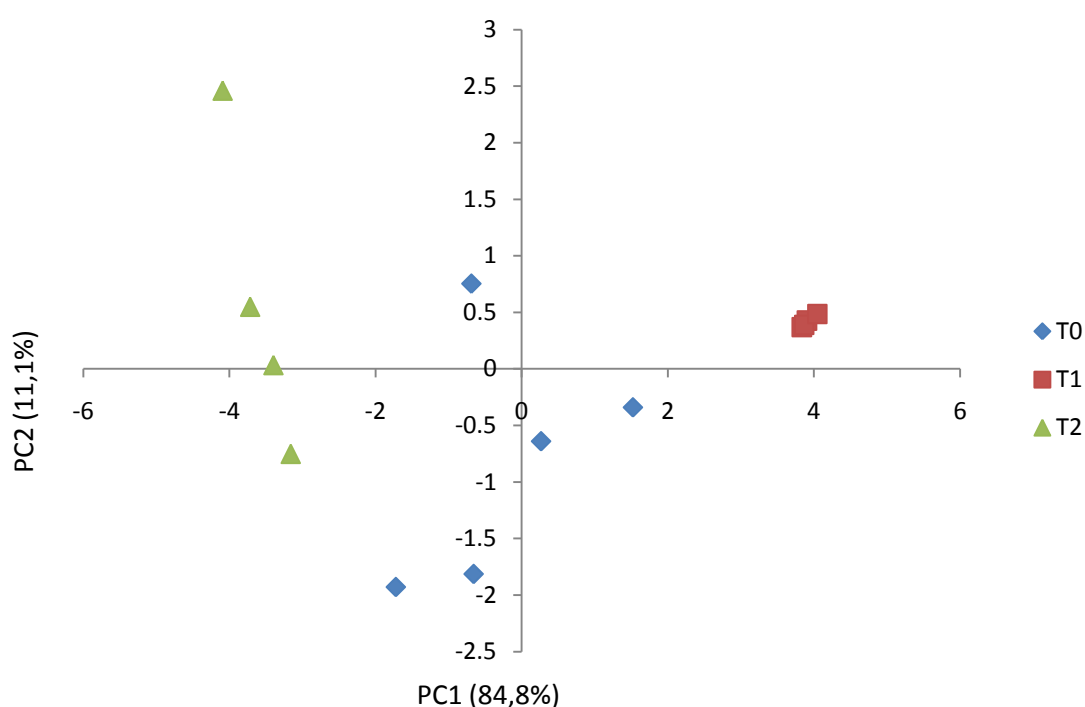


**Figura 38:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) relativo a fiambre fresco, dias 0, 2, 4, 6 e 8, marca A.

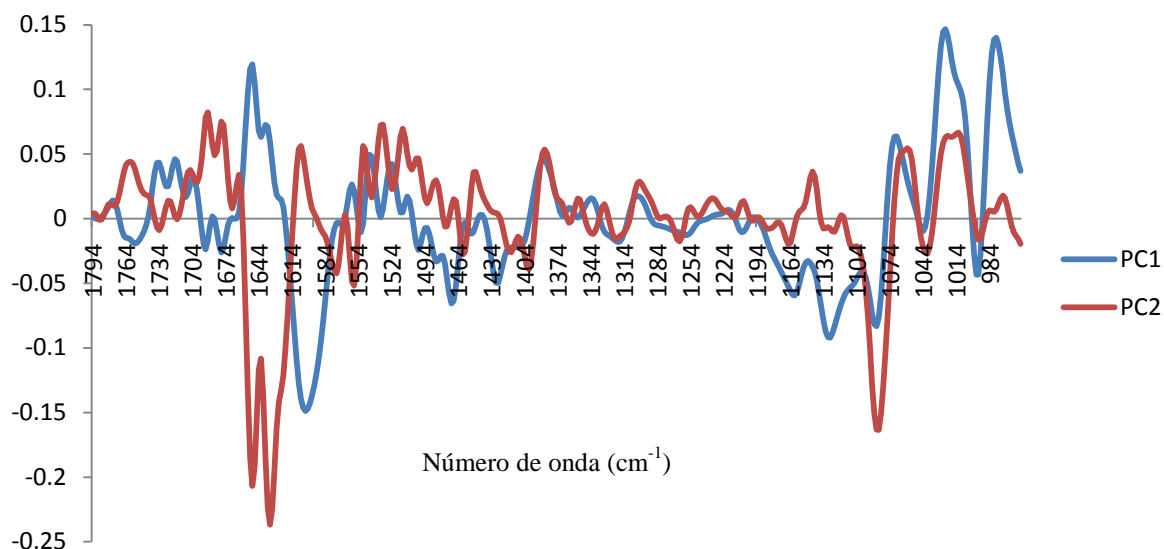


**Figura 39:** Mapa das contribuições (PC1 e PC3) relativo a fiambre fresco, dias 0, 2, 4, 6 e 8, marca A.

A figura 40 corresponde aos dias 0, 1 e 2 de análise de fiambre fresco, marca A, sendo que esta análise foi realizada para verificar se o método utilizado permitia distinguir diferenças em espaços de tempo mais curtos (de 24 em 24 horas). Como se verifica, existe uma separação das amostras por tempo de análise. A figura 41 corresponde ao mapa das contribuições factoriais, onde se verifica que a zona das amidas I e II de proteínas ( $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$ ) e a zona dos polissacarídeos ( $1300\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ ) são as que permitem a separação das amostras, sendo que a contribuição dos lípidos ( $1749\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ ) ainda não é determinante, talvez porque o crescimento bacteriano ainda não seja suficiente ou o intervalo de tempo seja demasiado pequeno para que se notem alterações neste aspecto.

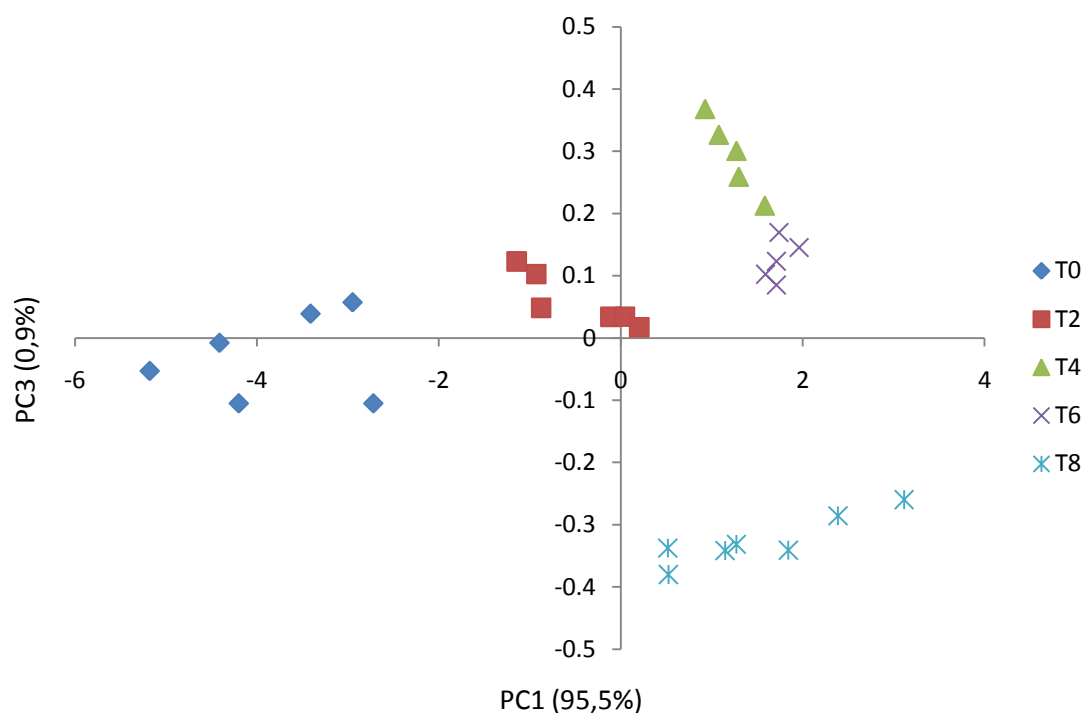


**Figura 40:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC2) relativo a fiambre fresco, dias 0, 1 e 2, marca A. Os dados foram previamente tratados com a 1ª derivada.

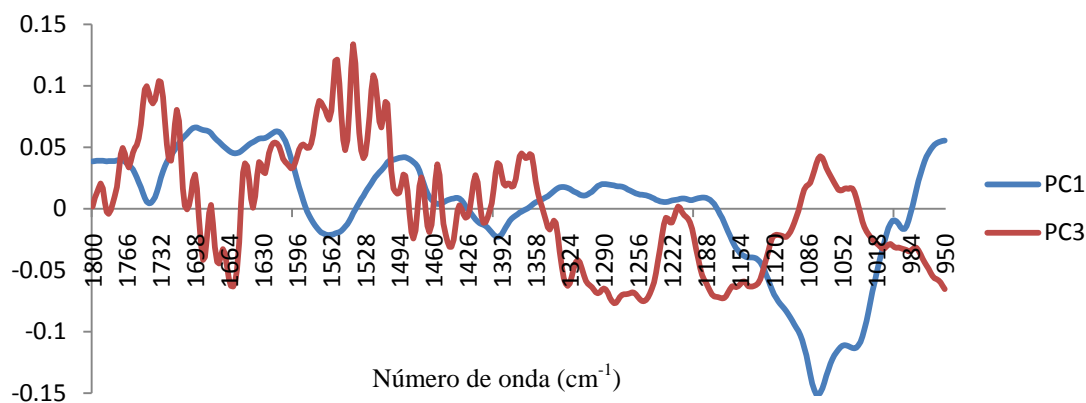


**Figura 41:** Mapa das contribuições factoriais (PC1 vs PC2) relativo a fiambre fresco, dias 0, 1 e 2, marca A.

A figura 42 apresenta os resultados relativos aos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 (dias) de análise do fiambre da marca B, verificando-se que os 2 primeiros tempos de análise estão distribuídos no PC1 negativo e os restantes no PC1 positivo, tal como aconteceu para a marca A. A figura 43 mostra que é na zona dos açúcares ( $1300\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ ) que os primeiros tempos de análise (T0 e T2) são caracterizados. As amostras presentes no PC3 positivo (T2, T4 e T6) contam com uma contribuição de amidas II (aproximadamente  $1550\text{ cm}^{-1}$ ).

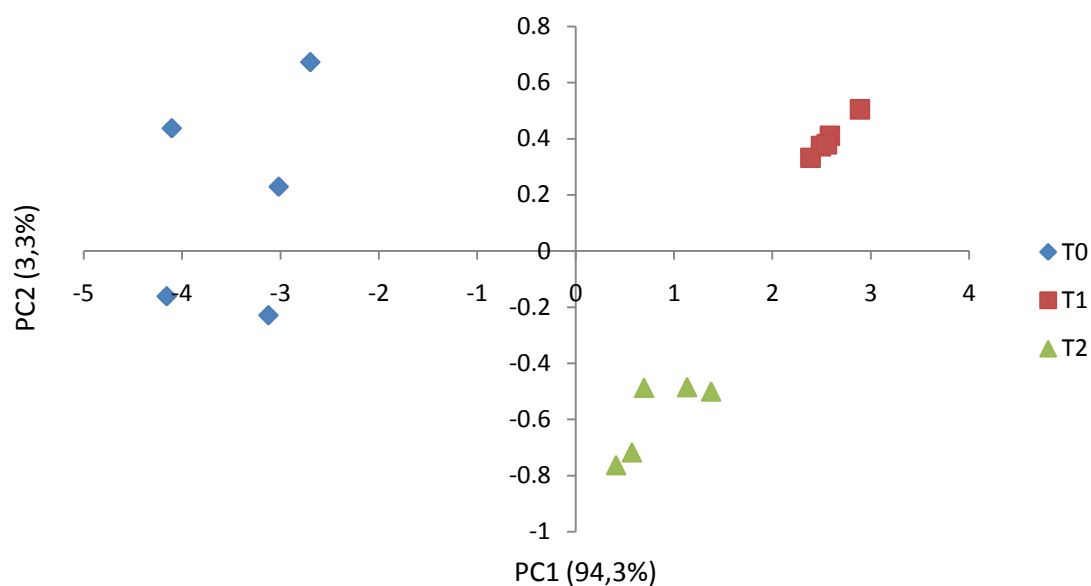


**Figura 42:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) relativas a fiambre fresco, para os dias 0, 2, 4, 6 e 8, marca B.

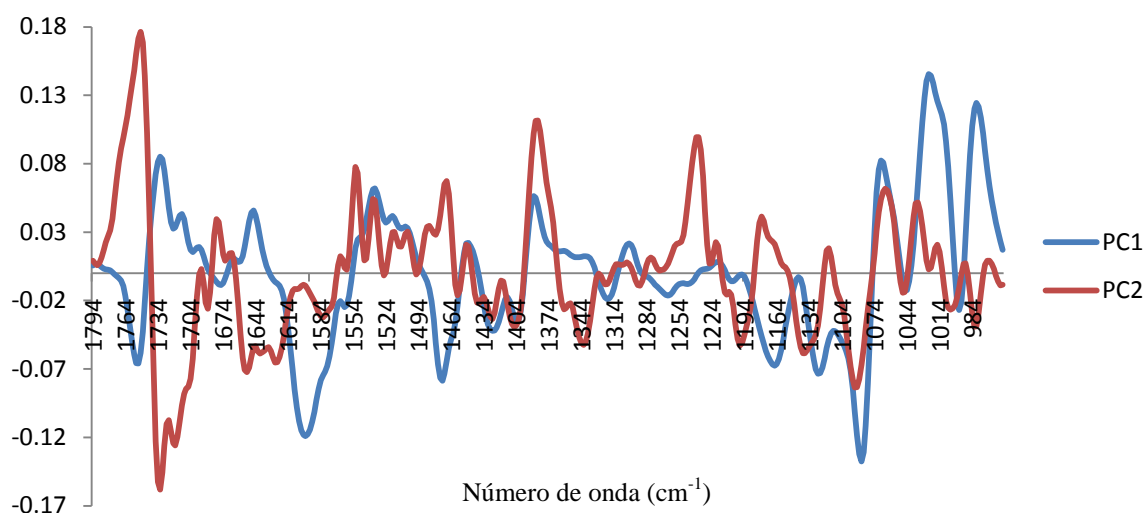


**Figura 43:** Mapa das contribuições factoriais (PC1 e PC3) relativas a fiambre fresco, para os dias 0, 2, 4, 6 e 8, marca B.

Na figura 44 verifica-se que existe uma separação das amostras por tempos de análise (T0, T1 e T2). O respectivo mapa das contribuições factoriais (figura 45) mostra que T0 (PC2 positivo predominantemente) está caracterizada na região dos lípidos (1750-1740  $\text{cm}^{-1}$ ) e todas as amostras apresentam variações na zona dos polissacarídeos (1300-959  $\text{cm}^{-1}$ ). Verificam-se ainda outros picos nesta zona que, no entanto, não são possíveis de especificar.

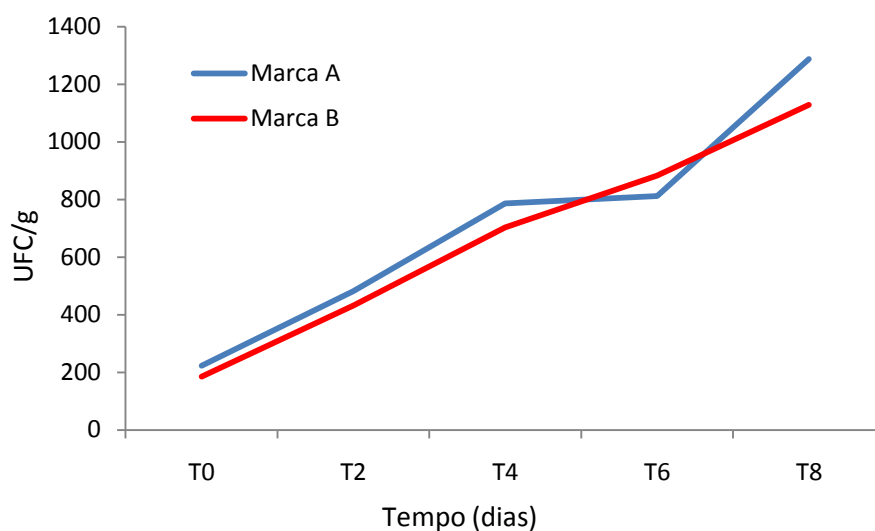


**Figura 44:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC2) relativo a fiambre fresco, dias 0, 1 e 2, marca B. Os dados foram previamente tratados com a 1ª derivada.



**Figura 45:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs PC3) relativo a fiambre fresco, dias 0, 1 e 2, marca A. Os dados foram previamente tratados com a 1ª derivada.

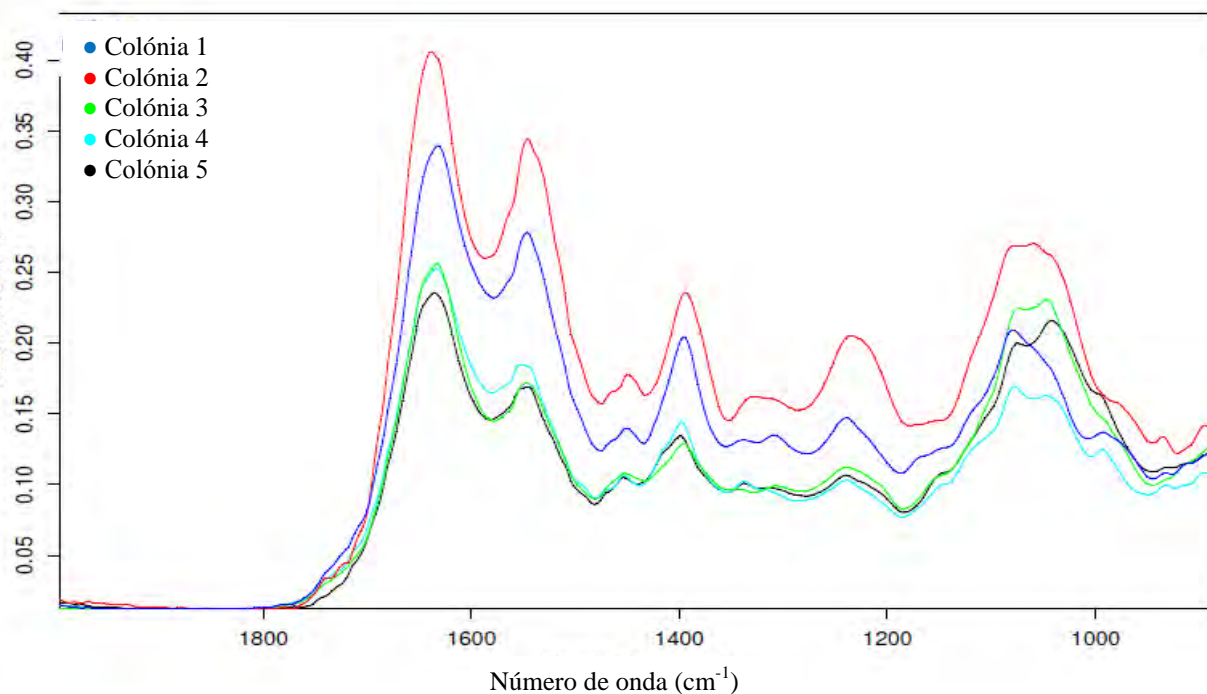
Na figura 46 estão apresentados os resultados da contagem de UFC para os vários tempos, para ambas as marcas. A marca B apresenta um aumento mais linear do que a marca A. O número de UFC encontra-se em concordância com o anteriormente verificado para o ensaio prévio com fiambre fresco (fatias de 0,5 cm), sendo a carga microbiana do fiambre muito parecida em ambos os ensaios, nos tempos de análise respectivos (Figura 8). Estas diferenças na carga microbiana foram detectadas no FT-IR.



**Figura 46:** Unidades formadoras de colônias para os vários tempos analisados, para fiambre fresco, marca A e B.

### 3.3. Obtenção de espectros de colônias de microrganismos

Na figura 47 estão representados os espectros de 5 colônias diferentes, obtidas da superfície de fiambre colocado a envelhecer à temperatura ambiente durante 3 dias.

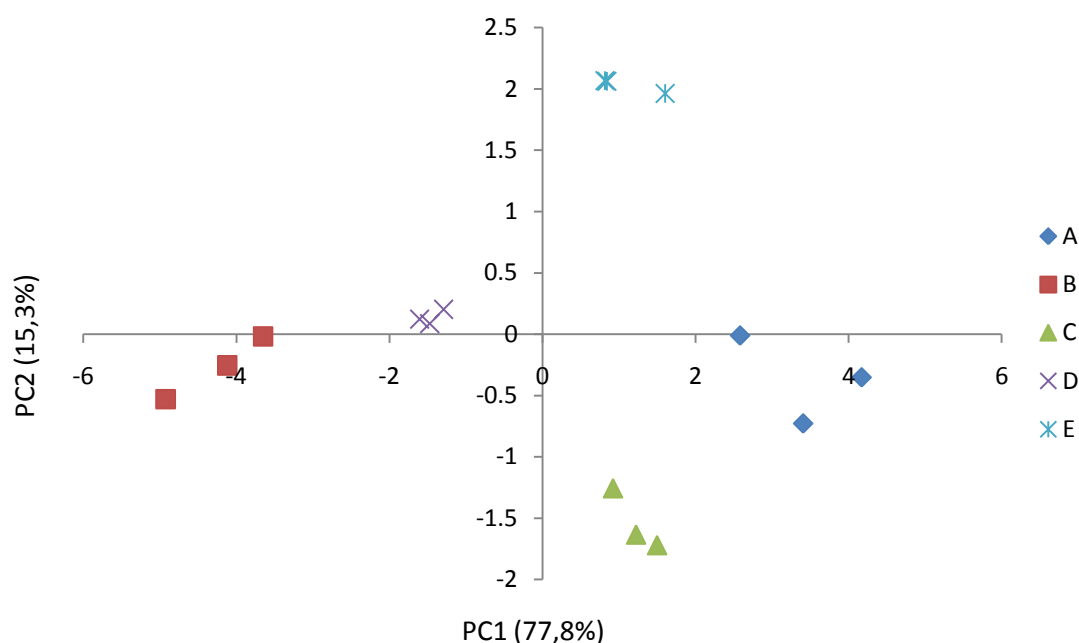


**Figura 47:** Espectros de infravermelho de 5 colônias distintas de bactérias, na zona de 2000 a 800  $\text{cm}^{-1}$ .

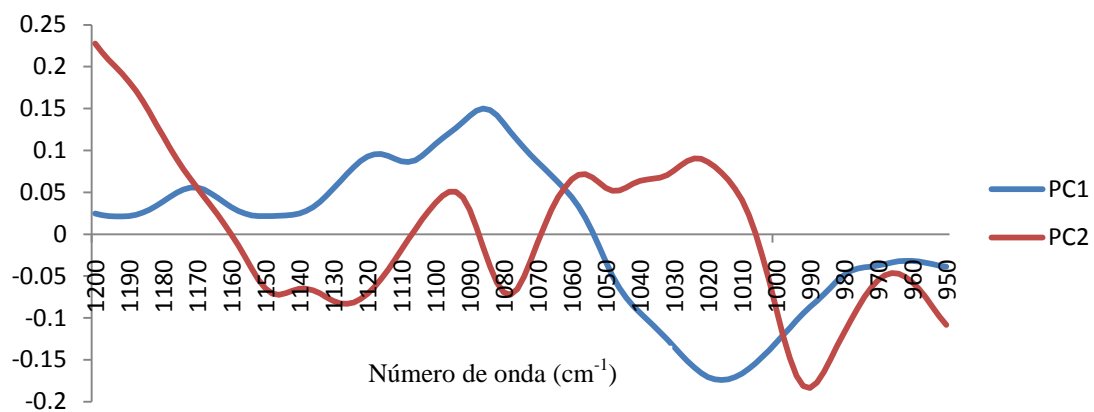
Os espectros obtidos no FT-IR são considerados padrões de “fingerprint” com alta reprodutibilidade, típicos para bactérias diferentes (Naumann, 1985). Neste caso, nota-se a diferença entre os espectros correspondentes a cada uma das 5 colónias, principalmente na zona entre 950 a 1200  $\text{cm}^{-1}$ , zona de variados tipos de ligações nomeadamente hidratos de carbono, tendo sido por isso escolhida apenas esta zona para a análise multivariada.

O diagrama das coordenadas factoriais (figura 48) mostra uma clara distinção entre as diferentes colónias, encontrando-se as colónias A e C no quadrante PC1 positivo e PC2 negativo, a colónia B no quadrante correspondente a PC1 e PC2 negativos, a colónia D está situada no PC1 negativo/PC2 positivo e a E, bem separada das restantes, em PC1 e PC2 positivos.

Observando o mapa das contribuições factoriais (figura 49), verifica-se que as amostras separam-se pelo seu teor em açúcares. Estudos onde se utilizou microscopia electrónica para estudar a superfície de colónias de *E. coli* mostraram que colónias que cresceram durante mais de 24 horas secretam um material extracelular semelhante a uma capa na sua superfície (Shapiro, 1987), sendo que este filme não foi encontrado para colónias com crescimento abaixo de 16 horas. Pensa-se que esta camada seja uma capa extracelular rica em polissacarídeos denominada glicocálice (Tetz e Rybalchenko, 1997), sendo por isso de esperar que os açúcares tenham uma contribuição bastante importante para a distinção das bactérias, como foi verificado.



**Figura 48:** Diagrama das coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) relativo a 5 colónias obtidas a partir de fiambre envelhecido à temperatura ambiente.



**Figura 49:** Mapa das contribuições factoriais (PC1 vs. PC2) relativo a 5 colónias obtidas a partir de fiambre envelhecido à temperatura ambiente.



## 4. CONCLUSÕES

No presente estudo, a espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier revelou ser um método bastante útil para a diferenciação entre vários tipos de fiambre, neste caso fiambre de porco, peru e frango, bem como diferentes marcas, podendo ser um método bastante vantajoso para a indústria alimentar. Face à globalização da indústria alimentar, a rastreabilidade assume actualmente um papel importante, sendo fundamental para qualquer estratégia de certificação. Os resultados obtidos sugerem que o FT-IR pode ser usado como método de rastreabilidade, podendo ser utilizado para identificar produtos alimentares e determinar quais as suas origens e métodos de produção.

Esta técnica, além de permitir diferenciar tipos e marcas de fiambre, também permite detectar a presença de produtos prejudiciais à saúde dos consumidores, promovendo a qualidade alimentar e protegendo o consumidor. Este estudo sugere a presença de ácido láctico no fiambre embalado, embora este composto não fosse referido no rótulo referente à composição do produto alimentar. A presença deste tipo de substâncias altera a flora microbiana do alimento tal como se observou neste estudo, uma vez que o fiambre embalado mostrou um teor de bactérias muito mais baixo do que o fiambre fresco com uma predominância de bacilos na flora presente, tendo sido previamente relatado que existem espécies de bacilos capazes de se adaptar a ácido láctico, nomeadamente *Bacillus cereus*. Valerá a pena em trabalhos futuros identificar os bacilos presentes nas amostras.

Em geral, é a contribuição de proteínas (amidas I e II), lípidos e polissacarídeos que permite a diferenciação das amostras. Como os invólucros celulares das bactérias têm na sua composição lípidos, polissacarídeos e proteínas, a espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier é indicada para avaliar a contaminação microbiológica em alimentos e para diferenciar microrganismos. Realmente, o método utilizado também permitiu distinguir fiambres com diferentes graus de contaminação, embora em muitas situações não tenha sido possível separar todos os tempos analisados, ou seja, a técnica utilizada só detectou diferenças quando o intervalo de tempo entre as análises foi de 2 dias ou, nalguns casos, 4 dias. No entanto, para o caso de fiambre fresco, foi possível separar amostras com 24 horas de diferença mesmo nos 3 primeiros dias, quando a carga microbiana ainda é relativamente baixa. No geral, foi utilizada a zona espectral compreendida entre 1800 e 950  $\text{cm}^{-1}$  para conseguir uma discriminação entre amostras com base na carga microbiana das mesmas. Esta zona do

espectro foi previamente relatada como sendo uma zona de “fingerprint” para a diferenciação de microrganismos. A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier tem mostrado ter sensibilidade para diferenciar colónias bacterianas, podendo mesmo detectar diferenças na própria colónia. Neste trabalho, os resultados dos ensaios com colónias mostram que é possível separá-las eficazmente. A distinção foi feita apenas com base na região dos hidratos de carbono ( $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ ), região esta previamente seleccionada como sendo uma das zonas de detecção e diferenciação de microrganismos. No entanto, quando um alimento apresenta contaminação por vários tipos de microrganismos, caso do fiambre, é difícil obter reprodutibilidade nos espectros, uma vez que a heterogeneidade das colónias faz com que os espectros de réplicas da mesma amostra sejam muito diferentes entre si. Isto foi verificado nos ensaios prévios deste estudo em que o fiambre se mediu directamente.

Tem sido mostrado que a leitura de amostras hidratadas no FT-IR, caso do fiambre, é difícil, uma vez que a água absorve muito, podendo o seu sinal mascarar picos interessantes para a diferenciação de amostras. Para este tipo de amostras a escolha do método de colheita é essencial. Neste estudo verificou-se que a recolha de líquido superficial do fiambre e a sua aplicação directa no acessório de amostragem foi o melhor método de preparação das amostras, pois foi aquele que permitiu obter resultados mais satisfatórios.

No geral, este estudo permitiu a distinção de amostras de fiambre com diferentes graus de contaminação e de diferentes colónias de microrganismos, tendo sido ainda possível a diferenciação de marcas e tipos de fiambre. No entanto, embora os resultados do trabalho tenham sido satisfatórios, há ainda um longo caminho a percorrer, por forma a desenvolver uma metodologia de amostragem que se adeque melhor ao produto analisado.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. e Moss, M. (2008). Food microbiology. 3rd Edition. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Almeida, C. (2006). Métodos espectroscópicos para o estudo da cerveja. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro.
- Blanco, M. e Villaroya, I. (2002). NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. Trends in Analytical Chemistry. 21, 240-250.
- Brereton, R. (2003). Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons, Ltd.
- Che Man, Y., Syahariza, Z., Mirghani, M., Jinap, S. e Bakar, J. (2005). Analysis of potencial lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Food Chemistry. 90, 815-819.
- Chen, J., Chiang, M. e Chou, C. (2009). Survival of the acid-adapted *Bacillus cereus* in acidic environments. International Journal of Food Microbiology. 128, 424-428.
- Choo-Smith, L., Maquelin, K., Vreeswijk, T., Bruining, H., Puppels, J., Ngo Thi, L., Kirschner, C., Naumann, D., Ami, D., Villa, A., Orsini, F., Doglia, S., Lamfarraj, H., Sockalingum, G., Manfait, M., Allouch, P. e Endtz, H. (2001). Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. Applied and Environmental Microbiology. 67, 1461-1469.
- Cordella, C., Moussa, I., Martel, A.-C., Sbirrazzuoli, N., e Lizzani-Cuvelier, L. (2002). Recent developments in food characterization and adulteration detection: Technique-oriented perspectives. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50, 1751–1764.

- Cotter, P. e Hill, C. (2003). Surviving the acid test: Responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67, 429-453.
- Cozzolino, D. e Murray, I. (2004). Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 37, 447-452.
- Ellis, D., Broadhurst, D., Lell, D., Rowland, J. e Goodacre, R. (2002). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 2822-2828.
- Garcia-Rey, R., Garcá-Olmo, J., Pedro, E., Quiles-Zafra, R. e Castro, M. (2005). Prediction of texture and colour of dry-cured ham by visible and near infrared spectroscopy using a fiber optic probe. *Meat Science*. 65, 713-719.
- Helm, D., Labischinski, H., Schallen, G. e Naumann, D. (1990). Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of General Microbiology*. 137, 69-79.
- Hollas, J. (2004). *Modern Spectroscopy*. 4th Edition. John Wiley & Sons, Ltd.
- Irudayaraj, J., Yang, H. e Sakhamuri, S. (2002). Differentiation and detection of microorganisms using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Journal of molecular structure*. 606, 181-188.
- Jay, J. M. (2000). *Modern food microbiology*. 6th Edition. Aspen Publisher, Inc. U.S.A.
- Jolliffe, I. (1986). *Principal component analysis*. 2nd Edition. Springer-Verlag. New York.
- Manning, C. e Griffiths, P. (1997). Noise sources in step-scan FT-IR spectrometry. *Applied Spectroscopy*. 51, 1092-1101.

- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L., Ngo-Thi, N., Vreeswijk, T., Stämmler, M., Endtz, H., Bruining, H., Naumann, D. e Puppels, G. (2002). Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 41, 324-329.
- Mellefont, L. e Ross, T. (2007). Effect of potassium lactate and a potassium lactate-sodium diacetate blend on *Listeria monocytogenes* growth in modified atmosphere packaged sliced ham. *Journal of Food Protection*. 70, 2297-2305.
- Naumann, D. (1985). The ultra rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR techniques. *SPIE, Fourier and Computerized Infrared Spectroscopy*. 533, 268-269.
- Nychas, G. e Tassou, C. (1997). Spoilage processes and proteolysis in chicken as detected by HPLC. *Science of Food and Agriculture*. 74, 199-208.
- Oliveira, S. (2006). Detecção de contaminações microbiológicas por FT-IR na alface [Relatório de Estágio]. Universidade da Beira Interior e Universidade de Aveiro.
- Patel, P. (1995). *Rapid analysis techniques in food microbiology*. Blackie Academic & Professional. London.
- Pereira, C. (2006). Detecção de contaminações microbiológicas em alimentos por FT-IR – produtos de origem animal [Relatório de Estágio]. Universidade da Beira Interior e Universidade de Aveiro.
- Rangel, P. (1999). *Rapid food analysis and hygiene monitoring*. Springer, New York.
- Rodriguez-Saona, L., Fry, F., McLaughlin, M. e Calvey, E. (2001). Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. 336, 63-74.

- Sakhamuri, S., Bober, J., Irudayaraj, J. e Demirci, A. (2004). Simultaneous determination of multiple components in nisin fermentation usins FTIR spectroscopy. Agricultural Engineering International: The CIGR Journal of Scientific Research and Development. Manuscript FP 03 008. March, 2004.
- Schimmt, J, e Flemming, H-C. (1998). FT-IR spectroscopy in microbial and material analysis. International Biodeterioration and Biodegradation. 41, 1-11.
- Shapiro, J. (1987). Organization of developing *Escherichia coli* colonies viewed by scanning electron microscopy. Journal of Bacteriology. 169, 142-156.
- Shlens, J. (2009). A tutorial on principal component analysis. In: [www.sn1.salk.edu/~shlens/pub/notes/pca.pdf](http://www.sn1.salk.edu/~shlens/pub/notes/pca.pdf). Acedido em 13 de Setembro de 2009.
- Silverstein, R., Webster, F. e Kiemle, D. (2003). Spectrometric identification of organic compounds. 7th Edition. John Willey & Sons.
- Smith, B. (1996). Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy. CRC Press.
- Stekelburg, F. e Kant-Muermans, M. (2000). Effects of sodium lactate and other aditives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Lysteria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 66, 197-203.
- Stuart, B. (2004). Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. John Wiley & Sons, Ltd., Australia.
- Syahriza, Z., Che Man, Y., Selamat, J. e Bakar, J. (2005). Detection of lard adulteration in cake formulation by Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy. Food Chemistry. 92, 365-371.
- Tetz, V. e Rybalchenko, O. (1997). Ultra structure of colony-like communities of bactéria. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica.105, 99-107.

- Thygesen, L., Lokke, M., Micklander, E. e Engelsen, S. (2003). Vibrational microspectroscopy of food: Raman vs. FT-IR. *Trends in Food Science and Technology*. 14, 50-57.
- Yu, C. e Irudayaraj, J. (2004). Spectroscopic characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers*. 77, 368-377.
- Viljoen, M., Hoffman, L. e Brand, T. (2005). Prediction of the chemical composition of freeze dried ostrich meat with near infrared spectroscopy. *Meat Science*. 69, 255-261.
- Vlachos, N., Skopelitis, Y., Psaroudaki, M., Konstantinidou, V., Chatzilazarou, A. e Tegou, E. (2006). Applications of Fourier-transform infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta*. 573-574, 459-465.